



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

DEIVID MARQUES SARMENTO

**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS DE POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO
TOCOLÍTICO DO 2-(3,4-DIHIDROXIFENIL)-3-FENIL-2,3-DIHIDROQUINAZOLIN-
4(1H)-ONA EM ÚTERO ISOLADO DE RATA**

JOÃO PESSOA - PB

2017

DEIVID MARQUES SARMENTO

**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS DE POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO
TOCOLÍTICO DO 2-(3,4-DIHIIDROXIFENIL)-3-FENIL-2,3-DIHIIDROQUINAZOLIN-
4(1H)-ONA EM ÚTERO ISOLADO DE RATA**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Coordenação do Curso de Farmácia da
Universidade Federal da Paraíba, como requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos

JOÃO PESSOA - PB

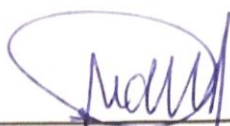
2017

DEIVID MARQUES SARMENTO

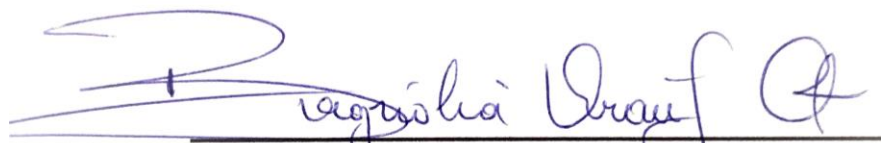
**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS DE POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO
TOCOLÍTICO DO 2-(3,4-DIHIIDROXIFENIL)-3-FENIL-2,3-DIHIIDROQUINAZOLIN-
4(1H)-ONA EM ÚTERO ISOLADO DE RATA**

Aprovado em 06/06/2017

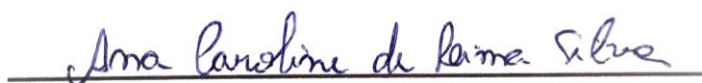
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos (Orientador)
(Departamento de Biologia Celular e Molecular – Cbiotec/UFPB)



Profa. Dra. Bagnólia de Araújo Costa
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – CCS/UFPB)



Msc. Ana Caroline de Lima Silva
(PgPNSB – CCS/UFPB)

S246p

Sarmiento, Deivid Marques.

Participação de canais de potássio no mecanismo de ação
tocolítico da 2-(3,4-dihidroxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-
4(1H)-ona em útero isolado de rato / Deivid Marques Sarmiento.
- João Pessoa: [s.n.], 2017.

78f.;il.

Orientador: Rafael de Almeida Travassos.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Útero. 3. Canais de potássio

BS/CCS/UFPB

CDU: 615.011(043.2)

DEDICATÓRIA

A meus pais **Carlos Augusto Ferreira Sarmiento** e **Maria Cely Marques Sarmiento** pelo exemplo de amor, força de trabalho, dedicação, apoio e incentivo durante toda minha vida. Vocês continuam sendo meu maior exemplo e minha maior motivação.

Aos meus irmãos **Danillo Marques Sarmiento** e **Diego Marques Sarmiento** que sempre apoiaram minhas decisões e me incentivaram a buscar o melhor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal da Paraíba** por possibilitar minha formação profissional.

A todos os professores do curso, em especial aos do **Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde (DCF/CCS/UFPB)**.

Ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos**, em não medir esforços para me orientar ao longo de 4 anos desde a iniciação científica até o TCC, por todos ensinamentos e conselhos para vida profissional e pessoal.

Aos membros da banca, **Prof^a. Dr^a Bagnólia Araújo Costa e a Msc. Ana Caroline de Lima Silva** pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Ao meu amigo e parceiro de laboratório **Sergio de Oliveira Santo Filho** por gentilmente se dispor a me ajudar na construção desse trabalho.

Aos demais companheiros do **Laboratório de Farmacobiotecnologia (FARMABIO) – Centro de Biotecnologia/UFPB** pelo acompanhamento, diálogos tidos e amizade. Vocês fazem parte deste trabalho.

Ao professor **Valdir de Andrade Braga** por ceder o **Laboratório de Controle Neural da Circulação e da Hipertensão Arterial (LACONCHA) - Centro de Biotecnologia/UFPB** para realização dos experimentos.

Aos meus amigos de graduação **Giulinana Amanda, Francisco Allysson, Raquel Fragoso, Lisandra Francilino e Danielly Araújo**, por cada conselho dado, por todos os momentos compartilhados e por sempre estarem dispostos a ajudar uns aos outros para conseguirmos prosseguir juntos durante o curso. Em minha identidade pessoal e profissional tem um pouco de cada um de vocês.

Aos demais colegas de graduação por todos os momentos dentro e fora da sala de aula. Desejo muito sucesso a cada um de vocês.

A **Deus**, que sempre esteve presente nesta caminhada, dando-me força e sabedoria, ajudando-me a conquistar as coisas que almejo. É através Dele que consegui conquistar mais uma etapa em minha vida.

A **meus pais** por toda confiança, dedicação e apoio em mim investidos para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus tios **Lúcia Ferreira** e **Ivaldir Campos** e aos meus primos **Ítalo Campos** e **Marielly Campos** por todo amor, carinho e suporte prestados a mim durante essa caminhada.

A todos que pontualmente não citei, mas que de alguma maneira contribuíram com esta conquista.

Meu eterno agradecimento,
Deivid Marques Sarmento

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

RESUMO

A atividade contrátil uterina desempenha um papel importante em muitas e variadas funções reprodutivas, incluindo transporte de esperma e embriões, nidação, menstruação, gestação e parto. Uma contratilidade anormal do miométrio uterino pode estar subjacente a desordens comuns e importantes, tais como infertilidade, falha na nidação, dismenorréia, endometriose, aborto espontâneo ou parto prematuro. O RETRO-2 e o RETRO-5 são dihidroquinazolinonas obtidos por síntese orgânica, que compartilham de um núcleo quinazolidínico em comum. Esse estudo teve como objetivo investigar um possível efeito tocolítico desses dois alcaloides dihidroquinazolinínicos em útero de ratas virgens. Para tanto segmentos de útero de rata foram suspensos em cuba para banho de órgãos isolados e as contrações isométricas foram monitoradas. O RETRO-2 foi capaz de relaxar de maneira satisfatória as tiras uterinas tendo uma eficácia de $E_{\max} = 42,3 \pm 6,8\%$ ($n = 5$) na concentração máxima utilizada. O RETRO-5 relaxou de maneira significativa e dependente de concentração o útero era pré-contráído por ocitocina, com maior potência ($CE_{50} = 2,4 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M, $n=5$) e eficácia ($E_{\max} = 99,3 \pm 0,4\%$, $n = 5$). No entanto, quando pré-contráído por 60 mM de KCl ($E_{\max} = 98,6 \pm 1,3\%$, $n=5$), teve sua potência atenuada ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,1 \times 10^{-4}$ M), sugerindo uma modulação positiva de canais de potássio. Na presença de TEA^+ 10 mM, bloqueador não seletivo dos canais de K^+ , o efeito tocolítico promovido por RETRO-5 foi atenuado ($CE_{50} = 1,5 \pm 0,6 \times 10^{-4}$ M; $E_{\max} = 98,6 \pm 1,3\%$ $n = 3$), confirmando a participação desses canais no mecanismo de ação da molécula. Na presença de bloqueadores seletivos como TEA^+ 1mM (bloqueador dos BK_{Ca}) ($CE_{50} = 3,6 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ M; $E_{\max} = 66,6 \pm 3,0\%$ $n = 3$), $BaCl_2$ (bloqueador dos K_{ir}) ($CE_{50} = 4,3 \pm 1,9 \times 10^{-5}$ M; $E_{\max} = 80,7 \pm 2,0\%$ $n = 3$) e 4-AP (bloqueador dos K_v) ($CE_{50} = 6,4 \pm 1,1 \times 10^{-5}$ M; $E_{\max} = 100\%$ $n = 3$), a potência relaxante do RETRO-5 não foi alterada, descartando a participação desses canais. Por outro lado na presença de glibenclamida (bloqueador dos K_{ATP}) a potência relaxante ($CE_{50} = 1,6 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M) e a eficácia ($E_{\max} = 72,4 \pm 8,0\%$, $n = 3$) foram atenuadas, o que também aconteceu na presença de apamina (bloqueador dos SK_{Ca}) onde, o RETRO-5 teve seu relaxamento praticamente abolido, com eficácia máxima de $18,4 \pm 4\%$. Esses resultados sugerem que os canais de potássio dos subtipos K_{ATP} e SK_{Ca} participam do mecanismo tocolítico da substância teste. Diante dos dados apresentados podemos sugerir que, pelo menos em parte e em nível funcional, o mecanismo de ação pelo qual o RETRO-5 exerce seu efeito tocolítico em útero de rata envolve a modulação positiva dos K_{ATP} e SK_{Ca} .

Palavras-chave: dihidroquinazolinona, útero, efeito tocolítico, canais de potássio.

ABSTRACT

Uterine contractile activity plays an important role in many and varied reproductive functions, including sperm and embryo transport, nidation, menstruation, gestation and childbirth. An abnormal contractility of the uterine myometrium may underlie common and important disorders such as infertility, failure of nidation, dysmenorrhea, endometriosis, miscarriage or premature delivery. RETRO-2 and RETRO-5 are dihydroquinazolinones obtained by organic synthesis, which share a common nucleus. This study aimed to investigate a possible tocolytic effect of these two dihydroquinazolinones in the uterus of virgin rats. For both segments of rat uterus were suspended in tub for isolated organs and isometric contractions were monitored. RETRO-2 was not able to significantly relax the uterine strips. RETRO-5, however, significantly relaxed and concentration-dependent ($EC_{50} = 2.4 \pm 0.6 \times 10^{-5}$ M) when the uterus was pre-contracted by oxytocin. However, when pre-contracted by 60 mM KCl, it had its attenuated potency ($EC_{50} = 1.1 \pm 0.1 \times 10^{-4}$ M), suggesting a positive channel modulation for potassium. In the presence of TEA + 10 mM, non-selective K^+ channel blocker, the tocolytic effect promoted by RETRO-5 was attenuated ($EC_{50} = 1.5 \pm 0.6 \times 10^{-4}$ M), confirming the participation of these channels in its mechanism. In the presence of selective blockers such as TEA + 1mM (BK_{Ca} blocker), $BaCl_2$ (K_{ir} blocker) and 4-AP (K_v blocker), the relaxing potency of RETRO-5 was not altered, discarding the participation of these channels. On the other hand, in the presence of glibenclamide (K_{ATP} blocker) the relaxing potency was attenuated ($EC_{50} = 1.6 \pm 0.2 \times 10^{-4}$ M) and in the presence of apamine (SK_{Ca} blocker) had its relaxation practically abolished, $E_{max} = 18.4\% \pm 4\%$, thus suggesting that these potassium channels are involved in the tocolytic mechanism of this substance. Given the data presented, we can suggest that, at least in part and at the functional level, the mechanism of action by which RETRO-5 exerts its tocolytic effect in rat uterus involves the positive modulation of K_{ATP} and SK_{Ca} .

Key words: dihydroquinazolinones, uterus, tocolytic effect, potassium channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos alcaloides dihidroquinazolínicos (A) 2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona (RETRO-2) e (B) 2-(3,4-dihidroxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona (RETRO-5).....	20
Figura 2 - Mecanismo fármaco-mecânico de contração do músculo liso via $G_{q/11}$ -PLC β_1	24
Figura 3 - Mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento da musculatura lisa	26
Figura 4 – Via de sensibilização ao cálcio para a manutenção da contração do músculo liso via G12/13-ROCK.....	28
Figura 5 - Efeito tocolítico do RETRO-2 (A) e RETRO-5 (B) sobre as contrações tônicas induzidas 10^{-2} UI/mL M de ocitocina, em útero isolado de rata.....	43
Figura 6 - Efeito tocolíticoRETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL M de ocitocina (■) ou 60 mM de KCl (■), em útero isolado de rata.....	45
Figura 7 – Efeito tocolítico do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL M de ocitocina na ausência (■) ou na presença de TEA $^{+}$ 10 mM (●), em útero isolado de rata.....	47
Figura 8 - Efeito tocolíticoRETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL M de ocitocina na ausência (■) ou na presença de 1 mM TEA $^{+}$ (▲) (A), na presença de 3×10^{-5} de BaCl $_2$ (▼) (B), na presença de 4-AP (○) (C) em útero isolado de rata.....	49
Figura 9 - Efeito tocolíticoRETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL M de ocitocina na ausência (■) ou na presença de glibenclamida (◆) (A) ou na presença de apamina (□) (B) em útero isolado de rata	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[(Ca^{2+})_4-CaM]$	Complexo cálcio-calmodulina
4-AP	4-aminopiridina
AC	Ciclase de adenilil
AMP	Monosfato cíclico de adenosina
BK_{Ca}	Canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância
CaM	Calmodulina
Cav	Canais de cálcio dependentes de voltagem
CavL	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
CE50	Concentração de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo
CICR	Liberação de cálcio induzida por cálcio
sCG	ciclase guanilil solúvel
DAG	diacilglicerol
e.p.m	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
G_{i/o}	proteína G _i ou proteína G _o
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
G_s	proteína G _s
IICR	Liberação de cálcio induzida por IP ₃
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
Kir	canais de potássio retificadores de entrada
Kv	canais de potássio dependentes de voltagem
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MTHP	1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
PGI₂	prostaglandina I ₂
PKA	proteína cinas-e dependente de CAMP

PKG	proteína cinase dependente de CGMP
PLC	fosfolipase C
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
RyR	receptor de rianodina
RS	retículo sarcoplasmático
REA	relação estrutura atividade
SK_{Ca}	canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância
TEA⁺	íon tetraetilamônio
cAMP	monofosfato de adenosina cíclico
cGMP	monofosfato de guanosina cíclico

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções que seguem o Sistema Internacional de Unidades (S.I.).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Alcaloides quinazolínicos.....	19
1.2 Músculo liso uterino	20
1.3 Principais vias de transdução de sinais envolvidas na contratilidade e no relaxamento do músculo liso uterino	22
1.4 Canais de potássio e a regulação do tônus muscular liso uterino	29
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 Geral.....	36
2.2 Específicos	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Material	37
3.1.1 Produto teste	37
3.1.2 Animais	37
3.1.3 Drogas e reagentes	37
3.1.4 Solução nutritiva	38
3.1.5 Equipamentos.....	38
3.2 Métodos	39
3.2.1 Investigação do efeito tocolítico do RETRO-2 e RETRO-5 em útero isolado de rata isolado	39
3.2.1.1 Efeito do RETRO-2, RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou KCl 60 mM.....	39
3.2.2 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no mecanismo de ação tocolítico do RETRO-5.....	40
3.2.2.1 Efeito do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA ⁺) 10 mM.....	40
3.2.2.2 Efeito do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de 4-aminopiridina (4-AP), glibenclamida, apamina, cloreto de bário (BaCl ₂) tetraetilamônio (TEA ⁺)	40
3.3 Análise Estatística	41
4 RESULTADOS.....	42

4.1 Investigação do efeito tocolítico do RETRO-2 e RETRO-5 em útero isolado de rata	42
4.1.1 Efeito do RETRO-2 e RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina.....	42
4.1.2 Efeito tocolítico do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl em útero isolado de rata	44
4.1.3 Efeito do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA ⁺) 10 mM.....	46
4.1.4 Efeito do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio	48
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO A – Certidão 070/2016 da Comissão de Ético no Uso de Animais da UFPB	75

1 INTRODUÇÃO

O músculo liso é um tecido amplamente distribuído pelo organismo, controlado pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA), podendo ser regulado por várias substâncias tanto de origem endógena quanto exógena. Esse tipo muscular é responsável por regular vários processos fisiológicos como manutenção da pressão sanguínea, da respiração, da motilidade gastrointestinal bem como a contração uterina. De acordo com o padrão de contração o músculo liso se classifica em dois tipos: fásicos e tônicos. Os fásicos possuem contração rítmica e intermitente, enquanto os tônicos apresentam contração sustentada. Isso é de extrema importância para o efeito que o tecido muscular liso vai exercer no órgão ao qual está presente (WIRTH; OFFERMANN, 2012).

As células da musculatura lisa fazem parte da parede de diversos órgãos internos, dentre eles podemos citar os vasos sanguíneos, estômago, bexiga, traqueia e brônquios, intestinos, ureteres, uretra e útero (WEBB, 2003). Vários distúrbios clínicos estão associados à desregulação da atividade do músculo liso como a doenças cardiovasculares, enxaqueca, retenção urinária, parto pré-maturo, problemas gastrointestinais, dismenorreia, trabalho de parto prematuro etc (WIRTH; OFFERMANN, 2012). Nesse sentido a busca por agentes farmacológicos que atuem sobre o músculo liso constitui hoje uma vasta área na pesquisa científica, uma vez que essas substâncias são candidatas a se tornarem alternativas farmacológicas as existentes (JENNIFER; THOMAS; IAIN, 2014).

Substâncias com atividade espasmolíticas são capazes de reduzir o tônus muscular liso, seja pela inibição da sua contração ou pela promoção do seu relaxamento. Atribui-se atividade tocolítica àquelas capazes de diminuir ou inibir a contração da musculatura lisa presente no miométrio. A atividade contrátil uterina desempenha um papel importante em muitas e variadas funções reprodutivas, incluindo transporte de espermatozoides e embriões, implantação, menstruação, gestação e parto. Uma contratilidade anormal do miométrio uterino pode estar intimamente relacionada a desordens como infertilidade, falha na nidação, endometriose, aborto espontâneo ou parto prematuro e dismenorreia (AGUILLAR, MITCHELL, 2010).

Compreender a fisiologia celular e molecular do útero é interessante por muitos pontos de vista. Em primeiro lugar, o miométrio apresenta certas peculiaridades quando comparado a outros músculos lisos. O miométrio é predominantemente um

músculo fásico, embora possa apresentar contrações tônicas quando exposto a altas concentrações de agonistas contráteis, como por exemplo, ocitocina (OCT) e prostaglandina F2 alfa (PGF_{2α}). O miométrio é pouco innervado e não apresentam células marcapasso (como as de Cajal no intestino) localizadas de forma definitiva. Em segundo lugar, o músculo liso uterino sofre alterações significativas na morfologia, na atividade contrátil basal e na responsividade durante a gestação, o trabalho de parto e pós-parto, tornando-o um sistema ideal para estudar as bases celulares e moleculares da adaptabilidade, diferenciação e involução. Além disso, a função miometrial é influenciada por hormônios esteroides e polipeptídicos e por citocinas e outras moléculas sinalizadoras. Este fato, aliado às mudanças nas respostas a esses estímulos ao longo da gravidez e do parto, torna este um modelo para se estudar os mecanismos moleculares de sinalização e a relação entre eles. Finalmente, a relativa quiescência do miométrio ao longo da gestação é fundamental para a manutenção da gravidez, enquanto contrações vigorosas altamente coordenadas são essenciais para o trabalho de parto efetivo (SANBORN, 2007).

O parto prematuro é o principal determinante da mortalidade infantil e há uma falta de tratamento para esta condição. Os receptores adrenérgicos β_2 (β_2 -ARs) desempenham um papel importante na regulação da contratilidade do útero no estado gravídico. Eles ainda são um dos principais alvos na terapia tocolítica, embora o significado terapêutico de seus agonistas no trabalho de parto prematuro seja constantemente questionado, principalmente devido às altas doses necessárias no final da gravidez. O elevado risco materno destes compostos é também uma desvantagem em comparação com outros tocolíticos (por exemplo, bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas da ocitocina, agentes anti-inflamatórios não esteróides e magnésio). Por outro lado, ainda não foi encontrado nenhum grupo de agentes significativamente melhor para tocolise do que os agonistas β_2 , embora os efeitos secundários do antagonista da ocitocina, como o atosiban, pareçam mais favoráveis do que os dos agonistas β_2 (BERKMAN et al., 2003; MOUTQUIN et al. 2000; WORLDWIDE ATOSIBAN versus BETA-AGONISTS STUDY GROUP, 2001).

Diante do que foi exposto, dois alcaloides dihidroquinazolínicos o 2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona (RETRO-2) e o 2-(3,4-dihidroxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona (RETRO-5) foram sintetizadas e um possível efeito tocolítico foi investigado em tiras uterinas obtidas de ratas virgens (Figura 1).

1.1 Alcaloides quinazolínicos

Os alcaloides correspondem a uma classe de substâncias químicas (metabólitos secundários) com distribuição abundante na natureza, derivadas de diversos organismos, incluindo fungos, bactérias, plantas e outros, além de se apresentarem com estruturas variadas e importantes atividades farmacológicas (BHADRA, KUMAR 2011).

As quinazolininas e seus derivados são compostos químicos N-heterocíclicos formados pela fusão de dois anéis aromáticos simples, um anel de benzeno e uma pirimidina. O seu núcleo quinazolínico é amplamente encontrado em alcaloides e outros compostos biologicamente ativos (SELVAM et al., 2011; PATI et al., 2013).

Biossinteticamente os alcaloides quinazolínicos derivam do ácido antranílico a exemplo da vasicina, evodiamina, febrifugina. A quinazolina foi isolada pela primeira vez a partir de uma planta chinesa, *Dichroa febrifuga* Lour. O desenvolvimento da pesquisa em relação à atividade biológica de derivados da quinazolina iniciou-se quando foi sintetizado o primeiro análogo desta família (2-metil-3-aryl-4-quinazolona), que apresentou ação sedativa e soporífica (SELVAM et al., 2011).

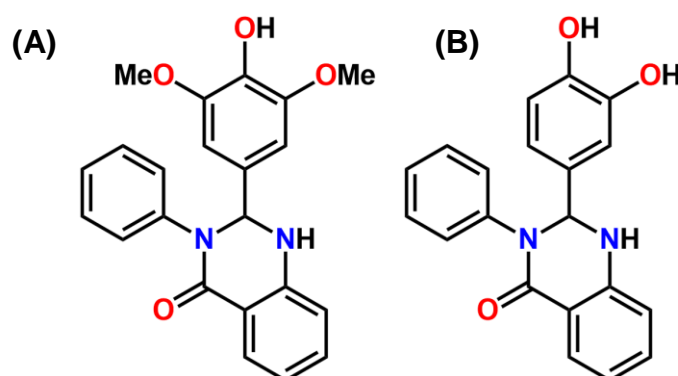
Devido às suas distintas atividades farmacológicas, nos últimos 10-20 anos, esta estrutura tem vindo a ser amplamente explorada tendo sido já determinadas diversas atividades biológicas de derivados da quinazolina, que incluem atividade anti-inflamatória, anti-bacteriana, analgésica, anti-viral, anti-citotoxina, anti-hipertensa, anti-obesidade, anti-psicótica, anti-convulsante, antitubercular, etc (SELVAM et al., 2011; WANG et al., 2013).

Alguns alcaloides dessa classe mostraram atividade em músculo liso como a prazosina, medicamento anti-hipertensivo já utilizado na terapêutica. Sua atividade vasodilatadora é decorrente do antagonismo nos receptores adrenérgicos α_1 presentes na musculatura lisa vascular. As quinazolininas, quinetazona e metolazona, são diuréticos já em utilização na terapêutica que atuam inibindo o co-transportador Na^+/Cl^- . A tetrodotoxina, um exemplo de alcaloide quinazolínico de ocorrência natural encontrada em espécies marinhas, é uma neurotoxina capaz de inibir a propagação de potenciais de ação devido bloqueio seletivo dos canais de Na^+ sensíveis a voltagem neuronais ($\text{Nav}1.6$) (BERGILLOS et al., 2013).

Compostos quinazolínicos também podem ter efeito inibidor sobre fosfodiesterases, enzimas chaves na regulação da contratilidade dos músculos liso e

cardíaco (MARIN, 2003). Esses dados demonstram a versatilidade dos alcaloides quinazolínicos em atuar com diversos alvos farmacológicos, levando ao interesse em utilizados na pesquisa por novos fármacos.

Figura 1 – Estrutura química dos alcaloides dihidroquinazolínicos 2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona (RETRO-2) **(A)** e 2-(3,4-dihidroxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona (RETRO-5) **(B)**.



Fonte: Rodrigues, LC, (2017)

1.2 Músculo liso uterino

Nos humanos, o músculo liso pode ser dividido em seis grupos principais – vascular, gastrintestinal, urinário, respiratório, ocular e genital – os quais apresentam propriedades bastante diferentes. Esses músculos têm diferentes funções no corpo e sua fisiologia reflete suas funções especializadas (SILVERTHORN, 2010).

Os miócitos lisos não estão em um estado terminalmente diferenciados sendo incrivelmente adaptáveis às mudanças em seu ambiente (TAGGART; MORGAN, 2007). Assim, o músculo liso altera o seu fenótipo em resposta a uma miríade de estímulos, como alongamento mecânico, aumento de estímulos sistêmicos (circulatórios), locais, ou inflamatórios (YOSHIDA, 2005). Estes estímulos podem causar, por exemplo, alterações na expressão de moléculas de sinalização intracelular, induzir crescimento e proliferação celular ou contração.

O útero, em particular o miométrio, por exemplo, tem de se adaptar a todos os estímulos decorrentes do processo fisiológico da gravidez: aumento do seu volume

com o desenvolvimento do feto e da placenta, aumento da sinalização parácrina de tecidos placentários/uterinos durante a gestação e produção de citocinas pró-inflamatórias na gestação a termo (39 semanas) (GIBB, CHALLIS, 2002; OSMAN et al., 2003).

Demonstrou-se que a expressão da conexina-43, um constituinte principal das junções comunicantes do miométrio, aumenta com a gestação, tanto nos tecidos humanos como em roedores (GARFIELD et al., 1978; INOUE, SPERELAKIS, 1991; GARFIELD et al., 1995). As junções comunicantes do tipo “gap” servem para interconectar miócitos adjacentes tanto elétrica quanto metabolicamente (YOUNG, 2007).

Durante os estágios finais da gestação o músculo liso uterino transforma seu padrão multiunitário (sem junções comunicantes do tipo “gap” entre as células) para unitário (com junções do tipo “gap”), isso permite a sincronização dos sinais elétricos, fazendo com que a musculatura uterina contraia de modo mais eficaz (SILVERTHORN, 2010). Como era de esperar, uma mutação na conexina-43 que provoca uma diminuição da conectividade intercelular reduziu a força das contrações miométriais, além de prejudicar a capacidade de resposta à ocitocina (OCT) (TONG et al., 2009).

Como o músculo liso uterino é espontaneamente ativo, mudanças no potencial de membrana são necessárias para a contração ocorrer (AGUILLAR, MITCHELL, 2010). A contração do músculo liso uterino é de natureza fásica, mostrando ciclos de contrações intermitentes discretas de amplitude, duração e frequência variáveis. Estas contrações são relativamente curtas e rápidas com períodos de relaxamento entre elas. Tal como na maioria dos outros tecidos excitáveis, a excitabilidade do músculo liso uterino é largamente determinada pelo movimento dos íons sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}) e cloreto (Cl^-) para o citoplasma e o movimento dos íons potássio (K^+) para o espaço extracelular (OTAIBI, 2014).

Parece que os padrões contráteis uterinos diferem no estado não gravídico do estado gravídico. Foi demonstrado que o útero não gravídico produz "atividade semelhante a uma onda" ao longo do ciclo menstrual envolvendo a camada subendometrial (VAN GESTEL, 2003). Por outro lado, durante o início da gestação as contrações uterinas são normalmente de padrão irregular com fraca intensidade para manter o feto, mas no momento do trabalho de parto essas contrações devem ser transformadas em um padrão muito forte e regular para expulsar o feto e a

placenta. No entanto, ao longo do período menstrual, o útero não gravídico poderia produzir contrações irregulares e descoordenadas e poderia produzir contrações semelhantes às do trabalho para expulsar a descamação do endométrio (IJLAND et al., 1996).

Uma série de eventos moleculares, envolvendo várias vias de sinalização celular, ocorre no miócito uterino para que o miométrio contraia ou relaxe. Compreender esses eventos é indispensável na pesquisa por novos agentes farmacológicos que atuem sobre a musculatura lisa regulando seu tônus. As principais vias relacionadas a esses processos serão abordadas a seguir.

1.3 Principais vias de transdução de sinais envolvidas na contratilidade e no relaxamento do músculo liso uterino

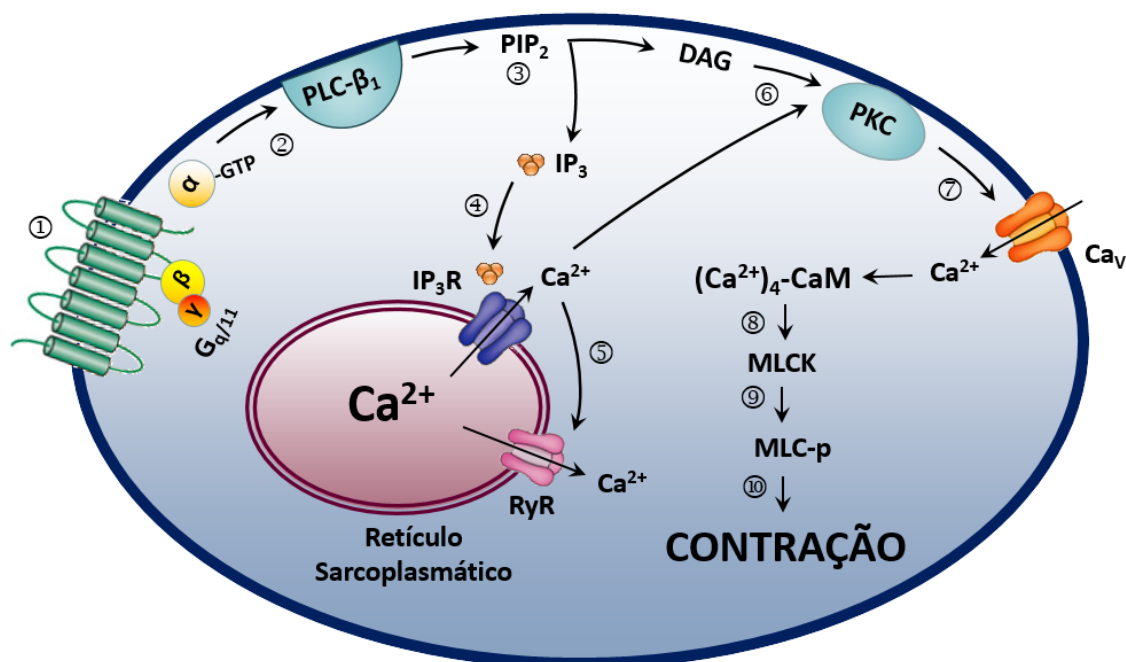
Contrações uterinas ocorrem durante todo o ciclo menstrual no estado não gravídico e durante a gestação. Existem quatro parâmetros importantes que mudam sob várias condições fisiológicas ou fisiopatológicas: frequência, amplitude, duração e direção da propagação. Na fase folicular precoce após a menstruação, ondas contráteis ocorrem uma ou duas vezes por minuto com baixa amplitude (geralmente <30 mmHg). À medida que a ovulação se aproxima, a frequência aumenta para 3-4 por minuto. Durante a fase lútea, a frequência e a amplitude diminuem talvez para facilitar a implantação. Na ausência de implantação de um blastocisto, a frequência de contração permanece baixa, mas a intensidade aumenta dramaticamente (50-200 mmHg), produzindo contrações semelhantes à do trabalho de parto no momento da menstruação. O aspecto mais fascinante das ondas endometriais é a direcionalidade integrada da atividade do músculo liso e as mudanças que ocorrem através do ciclo reprodutivo (AGUILLAR, MITCHELL, 2010). O útero não gravídico não é um órgão quiescente como alguns podem pensar e pode produzir contrações para facilitar a viagem dos espermatozoides para as trompas de uterinas e para ajudar a expulsar o revestimento interno do útero (endométrio) durante a menstruação (OTAIBI, 2014).

O útero é altamente 'miogênico' na medida em que se contrai *in vivo* e *in vitro* sem qualquer tipo de estímulo externo. Décadas de pesquisa utilizando uma variedade de técnicas histológicas não produziram evidência para a presença de células com as propriedades histológicas e eletrofisiológicas de um marcapasso

funcional (GHERGHICEANU, POPESCU, 2005; HINESCU, POPESCU, 2005; RADU et al., 2005; CRETOIU et al., 2006; HINESCU ET AL., 2006, 2007, 2008; POPESCU ET AL., 2006; MANDACHE et al., 2007; POPESCU ET AL., 2007; SUCIU et al., 2007) tal como foi descrito em outros tecidos incluindo o intestino e a uretra (SERGEANT et al., 2000, HUIZINGA E LAMMERS, 2009).

O acoplamento excitação-contração no miométrio pode ocorrer através de dois mecanismos principais: o acoplamento eletroquímico ou farmacomecânico. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) é uma condição inexorável em ambos os acoplamentos para que a contração ocorra. No acoplamento eletroquímico, o principal impulsionador para o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é a despolarização da membrana plasmática. A alteração da permeabilidade iônica da membrana celular uterina leva à geração de potencial de ação, o que, portanto, despolariza a membrana celular e abre os canais de cálcio controlados por voltagem do tipo L (VGCC) resultando em um influxo de Ca^{2+} (TAGGART, 2001). No acoplamento farmacomecânico o aumento na nos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos depende da ligação de agonistas contráteis (ocitocina, $\text{PGF}_{2\alpha}$) aos seus receptores acoplados a proteína $G_{q/11}$ (GPCR's) e consequente ativação da via da fosfolipase C- $\beta 1$ (PLC- $\beta 1$) que possui o 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e o diacilglicerol (DAG) como segundos mensageiros juntamente do Ca^{2+} liberado dos estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático (RS), por ação do IP_3 nos seus receptores (IP_3R). O sistema efetor da via da PLC- $\beta 1$ é a proteína cinase C (PKC) que quando ativada pelo Ca^{2+} liberado e pelo DAG vai promover um aumento no influxo de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} controlados por voltagem (Ca_v) de maneira direta, quando promove um aumento no tempo que o canal permanece na conformação aberta, e indireta, quando promove a inativação do canais de potássio K^+ e consequente despolarização da membrana por acúmulo de carga positiva no interior da célula. Esse grande aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ativa uma proteína ligante de Ca^{2+} do músculo liso a calmodulina (CaM), formando um complexo 4- Ca^{2+} -CaM que é responsável por ativar a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) que vai então fosforilar o resíduo Ser^{19} das cadeias regulatórias da miosina (MLC20) permitindo então a formação das pontes cruzadas com a actina e consequente contração (Figura 2) (HIRAT et al., 1998; AKATA, 2007; SANDOO et al., 2010; GNUS et al., 2013; CURRÒ, D., 2016).

Figura 2 – Mecanismo fármaco-mecânico de contração do músculo liso via $G_{q/11}$ - $PLC_{\beta 1}$



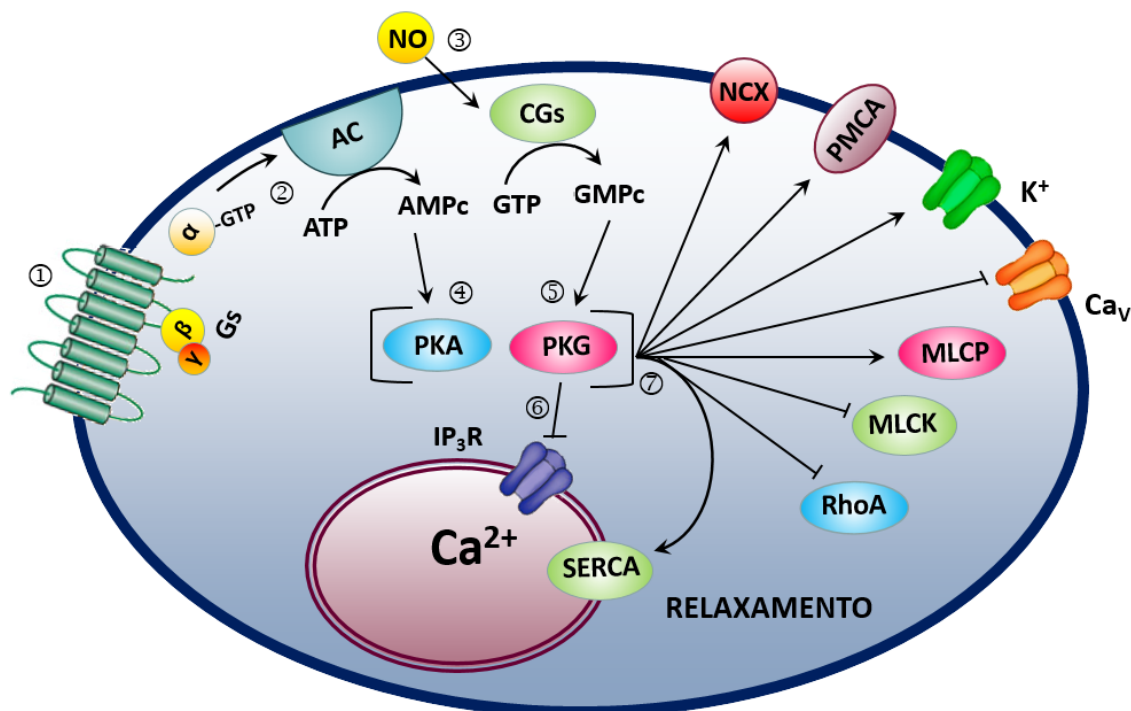
(1) O agonista se liga ao receptor GPCR na membrana plasmática e as proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP em sua subunidade α , tornando-se ativa; (2) a subunidade $\alpha_{q/11}$ GTP ligado, ativa a enzima $PLC-\beta_1$; (3) a $PLC-\beta_1$ hidrolisa o fosfolípido de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; (4) o IP_3 ativa o IP_3R na membrana do RS, liberando Ca^{2+} dos estoques; (5) o Ca^{2+} liberado ativa o RyR aumentando a liberação de Ca^{2+} para o citoplasma; (6) o Ca^{2+} liberado pelo RS se liga na PKC e a transloca para a membrana, onde é ativada pelo DAG; (7) a PKC uma vez ativada, fosforila o Ca_v na membrana da célula promovendo um influxo de Ca^{2+} para o citoplasma; (8) o aumento global de $[Ca^{2+}]_i$ favorece a formação do complexo $(Ca^{2+})_4-CaM$ que ativa a MLCK; (9) a MLCK ativada fosforila a MLC; (10) a MLC fosforilada favorece sua interação com os filamentos finos de actina, desencadeando a contração do músculo liso.

Fonte: Travassos, RA (2015).

Os dois principais mecanismos que ocorrem no relaxamento do músculo liso envolve a ação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), que retira o fosfato da miosina impedindo a formação das pontes cruzadas, e a diminuição do $[Ca^{2+}]_i$, que pode ocorrer pela inibição da via da $PLC-\beta_1$ e pela ativação de enzimas intracelulares que ciclizam nucleotídeos. A via da $PLC-\beta_1$ pode ser inibida tanto pela ativação de receptores acoplados a proteína G_i , que inibe diretamente sua atividade, bem como pelo antagonismo do receptor que antes ativava a via. Contudo, a ativação de enzimas que ciclizam nucleotídeos, como a ciclase de adenilil (AC) e a

ciclase de guanilil solúvel (sCG), consiste no principal mecanismo para o relaxamento muscular liso. A ativação da AC ocorre por meio da ligação de um agonista relaxante (terbutalina, prostaciclina) a um receptor que acople a proteína G_s , enquanto que a sCG é ativada pelo óxido nítrico (NO) produzido pelas células endoteliais. Quando ativas a AC e a sCG provocam um aumento nos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e do monofosfato cíclico de guania (cGMP), respectivamente. O aumento desses nucleotídeos cíclicos irá ativar suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG, as quais irão fosforilar alvos proteicos responsáveis pela diminuição do $[Ca^{2+}]_i$, como a ativação de canais de potássio e inativação de canais de cálcio, além da ativação da cálcio-ATPase da membrana plasmática (PMCA) e do retículo endosarcoplasmático (SERCA), do trocador sódio-cálcio (NCX), inativação da MLCK e da RhoA, bem como uma modulação negativa dos receptores de IP_3 (IP_3R) na membrana do retículo (Figura 3) (BLAUSTEIN, 1989; LINCOLN; KOMALAVILAS, 2000; HOFMANN et al., 2006; ANDRADE, 2014; JENNIFER, M. H; KENNETH, L. B, 2016).

Figura 3 – Mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento da musculatura lisa.



(1) O agonista se liga ao receptor GPCR na membrana plasmática e a proteína G_s troca GDP por GTP em sua subunidade α , tornando-se ativa. (2) A subunidade α_s GTP ligado, ativa a ciclase de adenilil (AC) que converte ATP em CAMP. (3) O NO estimula a sCG que converte GTP em CGMP. Os nucleotídeos cíclicos, CAMP e CGMP, ativam suas proteínas cinases correspondentes, PKA (4) e PKG (5). (6) Fosforilação do IP_3R pela PKG mas não pela PKA. (7) Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: aumentam a atividade da SERCA e PMCA, ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX), ativam canais de K^+ e inibem os Ca_v ; todos esses eventos levam à diminuição do cálcio intracelular. Além disso PKA e PKG podem ativar MLCP via MYPT1, inibir a MLCK e a RhoA. Todos esses eventos impedem a fosforilação da MLC e consequentemente a sua interação com os filamentos finos de actina, favorecendo o relaxamento.

Fonte: Travassos, RA (2015)

A atividade de fosforilação/desfosforilação da MLCK e da MLCP pode ser modulada por agonistas que se ligam aos seus receptores específicos na membrana do miométrio levando a alterações no nível do aparelho contrátil sem alterações na $[Ca^{2+}]_i$ (OTABI, 2014). Após a estimulação com um agonista endógeno tal como ocitocina, um determinado aumento de $[Ca^{2+}]_i$ causará uma força de contração maior do que a esperada. Este fenômeno é conhecido como sensibilização ao Ca^{2+} (SOMLYO, SOMLYO, 1998). Esse mecanismo se dá a partir da pequena proteína G (RhoA) e o seu alvo Rho cinase (ROCK) que desempenham um papel importante na

regulação da atividade da MLCP. A MLCP consiste em 3 subunidades: uma catalítica, PP1c; uma regulatória, MYPT1 e outra de 20 kDa de função ainda desconhecida (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MURTHY, 2006). A ROCK, uma cinase de serina/treonina, fosforila a subunidade MYPT1 da MLCP, inibindo a sua atividade e, assim, promovendo o estado fosforilado da MLC, o que é favorável a contração. A ativação da RhoA, dependente das proteínas G heterotriméricas G_{12} , G_{13} e G_q , via uma pequena proteína G associada a um fator de troca de nucleotídeos de guanina (RhoGEFs). A RhoGEFs faz com que a RhoA troque GDP por GTP e uma vez RhoA-GTP ligado estimula a sua cinase associada (ROCK) e uma fosfolipase D (PLD) específica para fosfatidilcolina, liberando ácido fosfatídico que é desfosforilado a diacilglicerol (DAG) levando a ativação sustentada da proteína cinase C (PKC) (EXTON, 1997; MURTHY, 2006). A ativação da PKC pode resultar da ativação, dependente de $G_{q/11}$, da fosfolipase C (PLC) que forma DAG a partir da hidrólise do 4,5-bisfosfato de inositol (PIP2). A ROCK e a PKC agem isoladas ou cooperativamente para inibir a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2000). Embora a ROCK fosforile diretamente a MLC, sua ação principal na sensibilização ao cálcio parece ser a inibição da MLCP, esta ação se dá pela fosforilação da subunidade regulatória da fosfatase da miosina (MYPT1) (TOTSUKAWA et al., 2000; SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROCK pode também ativar uma proteína cinase independente de Ca^{2+} , mais conhecida como proteína cinase de interação “zipper” (ZIPK). A ZIPK pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto seu alvo principal, assim como a ROCK, é a MYPT1 inibindo a ação da MLCP (MURTHY, 2006). A PKC pode fosforilar uma proteína inibitória endógena CPI-17, aumentando assim sua potência inibitória sobre a subunidade catalítica da MLCP (PP1c) por mais de 1.000 vezes (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MURTHY, 2006). A proteína quinase G (PKG) fosforila Ser⁶⁹⁵ de MYPT1 o que causa relaxamento, provavelmente interferindo com a fosforilação basal de Thr⁶⁹⁶ pela ROCK (Figura 4) (NAKAMURA et al., 2007).

A fosforilação mediada por PKA de um local na região de ligação da CaM na MLCK, que prejudica a capacidade de CaM para activar a enzima, mostrou diminuir a actividade contrátil uterina (STULL ET AL., 1993). A variedade de alvos de fosforilação disponíveis no MYPT1 indica que esta proteína pode ser um ponto de convergência chave para muitas vias de sinalização envolvidas na modulação da

significativa na quantidade de proteínas G_s ativadas pelos agonistas dos receptores adrenérgicos β_2 . Taggart e Morgan (2007) evidenciaram que a contração induzida por agonistas no miométrio gravídico é menos dependente da fosforilação das cadeias regulatórias da miosina (MLC20) do que no miométrio não gravídico, provavelmente pela expressão de diferentes isoformas de MLC20. A expressão da PMCA e da SERCA aumenta durante o trabalho de parto, indicando um possível papel funcional destas enzimas no parto (PAUL 1998, TAGGART, WRAY, 1998; SHMIGOL, et al., 1999; TRIBE, et al., 2000).

1.4 Canais de potássio e a regulação do tônus muscular liso uterino

A função miometrial é influenciada por hormônios esteróides e polipeptídicos e por uma miríade de citocinas e outras moléculas sinalizadoras. Este fato, aliado às marcadas mudanças nas respostas a esses estímulos ao longo da gravidez e do parto, torna este um modelo atraente sistema para se estudar os mecanismos moleculares de sinalização e a relação entre eles (SANBORN, 2007). Os canais iônicos do miométrio são alvos de uma infinidade de sinais biológicos, incluindo hormônios, peptídeos, mudanças de pH e voltagem, isso têm importantes consequências para a função miometrial (KHAN et al., 2001; NOVAKOVIĆ et al., 2007).

O potencial de membrana em repouso (V_{rest}) dos miócitos uterinos foi registrado entre -35 e -80 mV (SANBORN, 2000). A excitabilidade dos miócitos uterinos, como a maioria dos outros tipos de células excitáveis, depende do movimento dos íons Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- para dentro do compartimento citosólico a partir do espaço extracelular e dos íons K^+ na direção oposta. Os três primeiros estão concentrados no espaço extracelular, enquanto o último está concentrado no meio intracelular de SMCs (SANBORN, 1995). Ao passo que os vários tipos canais de K^+ atuam no estabelecimento do potencial de repouso os canais de Ca^{2+} e Na^+ contribuem para despolarização do potencial de membrana, o que torna o miócito liso mais excitável o que favorece a propagação do potencial de ação ou até mesmo uma contração. Dois tipos de potenciais de ação (PAs) foram registrados em músculo liso uterino, um de várias espécies simples, envolvendo despolarização seguida de repolarização rápida e outra complexa, que implicam uma

despolarização inicial com um patamar sustentado. Diferentes combinações de correntes iônicas podem estar em jogo durante esses dois padrões diferentes de atividade elétrica (KHAN et al., 2001; BURSZTYN et al., 2007). Embora um PA único seja suficiente para induzir a propagação de uma onda elétrica de atividade no miométrio, são necessárias múltiplas despolarizações coordenadas para contrações vigorosas e sustentadas (GARFIELD, MANER, 2007).

Os canais de cálcio e potássio estão intimamente relacionados com a regulação da excitabilidade do músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). No músculo liso uterino os principais canais envolvidos nessa regulação são os canais de K^+ dos subtipos sensíveis ao ATP (K_{ATP}), sensíveis ao Ca^{2+} de grande e pequena condutância (BK_{Ca} , SK_{Ca} , respectivamente) e os sensíveis à voltagem (K_V), além dos canais de Ca^{2+} controlados por voltagem (Ca_v) dos tipos L e T.

Os canais de potássio compreendem um grupo de proteínas que contribuem significativamente para a quiescência uterina durante a gravidez. Nos miócitos miometriais, as alterações na expressão ou atividade dos canais de K^+ podem traduzir-se numa repolarização inadequada que conduz a uma atividade uterina anormal. Uma variedade de canais de K^+ com propriedades farmacológicas, cinéticas e elétricas diferentes foram identificados em miócitos uterinos humanos (KHAN et al., 2001). Nas células do miométrio, os canais de K^+ são um componente subjacente do mecanismo que permite a adaptação do útero gravídico aos aumentos no estiramento e na pressão intra-uterina. Até à data, vários tipos de canais de K^+ foram identificados no miométrio. Os mais abundantes e bem estudados incluem o canal de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de grande condutância (canal BK_{Ca}), o canal de K^+ sensível ao Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}), o canal K^+ sensível ao ATP (K_{ATP}) e o canal de K^+ sensível a voltagem (K_V). Estes canais, quando abertos conduzem uma corrente externa durante os períodos em que o músculo não está ativo, e assim mantêm o estado de repouso. Alterações na expressão ou na atividade desses canais de K^+ pode contribuir para condições fisiopatológicas como parto prematuro, trabalho pós-parto e distocia (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

Os canais BK_{Ca} (também conhecidos como maxi-K e slo) são canais K^+ de grande condutância, sensíveis ao Ca^{2+} e a voltagem. Eles são um dos canais de íons mais extensamente estudados no músculo liso uterino devido à sua abundância e corrente repolarizante significativa. Relativamente poucos canais BK_{Ca} precisam

ser ativados para produzir relaxamento uterino. Assim, esses canais podem ter efeitos profundos na atividade miometrial. Em miócitos uterinos não grávidos os canais BK_{Ca} contribuem com aproximadamente 35% da corrente repolarizante de K⁺ (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007). Os canais BK_{Ca} mediam o relaxamento uterino em resposta à ativação da ciclase de adenilil (AC), que está mais expressa na meia gestação do que na gestação tardia. (OKAWA et al., 2000). O óxido nítrico (NO) também medeia o relaxamento uterino na gravidez através da ativação dos canais BK_{Ca}, e esse efeito depende do estágio gestacional. O óxido nítrico foi menos eficaz na indução do relaxamento uterino em ratos tardios comparados com os de meia-gestação (OKAWA et al., 1999). Em miócitos grávidas humanos, a probabilidade de estado aberto do BK_{Ca} aumenta em resposta a um doador de NO (SHIMANO et al., 2000). Atualmente, não se sabe se a activação de NO dos canais de BK_{Ca} do miométrio é por interação direta e/ou activação indireta através de vias cíclicas cGMP dependentes (OKAMA et al., 1999; SHIMANO et al., 2000).

É evidente que os canais BK_{Ca} são alterados durante a gravidez para aprimorar sua resposta às moléculas que podem regular sua atividade. Estudos moleculares e celulares elucidaram que a regulação diferencial dos canais BK_{Ca} durante a gestação resulta de vários mecanismos incluindo splicing alternativo, associação com subunidades β acessórias, modificação pós-translacional e associação com proteínas que regulam a expressão do canal e o fenótipo atual. A expressão de diferentes isoformas de BK_{Ca} durante a gestação é um mecanismo provável para a modulação da excitabilidade miometrial durante a gravidez. Em miócitos de gestação tardia observa-se uma diminuição das correntes geradas pelos canais BK_{Ca} concomitante a uma contribuição maior de outros tipos de canais de K⁺ repolarizantes (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007). Nos seres humanos, a isoforma mK44 contém 44 aminoácidos adicionais no primeiro ciclo intracelular e é menos sensível ao Ca²⁺ e à tensão em comparação com os canais BK_{Ca} sem estes 44 aminoácidos (KOROVKINA, 2001). Embora os níveis de transcrição do canal BK_{Ca} diminuam na gravidez tardia e no período da gestação a termo em humanos (MATHAROO-BALL et al., 2003), os níveis de transcrição de mK44 é aumentam a longo prazo, sugerindo que esta isoforma pode modular a atividade uterina perto do trabalho de parto (CURLEY; MORRISON; SMITH, 2004). Outra isoforma de BK_{Ca} é a STREX, isoforma com 59 aminoácidos que introduz um segundo domínio para

fosforilação pela PKA que inibe a atividade do canal ao invés de ativar. Essa isoforma é regulada durante a gravidez pelo ACTH, 17 β -estradiol e progesterona, sendo menos expressão ao longo da gestação (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

A associação dinâmica do canal BK_{Ca} com uma subunidade β acessória é outro mecanismo molecular que fornece a diversidade da função BK_{Ca} em miócitos lisos uterinos. Quatro genes distintos, *KCNMB1-4*, codificam as subunidades β do canal BK_{Ca} com a subunidade β_1 sendo a isoforma predominante presente no miométrio (BEHRENS et al., 2000). A subunidade β_1 do canal BK_{Ca} aumenta a tensão e a sensibilidade ao cálcio do canal (McMANUS, 1995), resultando em uma melhor ativação dos canais BK_{Ca} para diminuir a excitabilidade uterina e atenuar as contrações. No útero gravídico humano, a expressão da subunidade β_1 foi menor durante o trabalho de parto e período pré-termo em comparação com um estado sem trabalho de parto. O desacoplamento dos canais BK_{Ca} de suas subunidades β_1 geraria canais com baixa sensibilidade ao Ca^{2+} . Durante o período de gestação a termo humano e o trabalho de parto prematuro, no entanto, uma diminuição na expressão de ambas as proteínas, mas não no desacoplamento, parece ser um mecanismo para induzir contrações (MATHAROO-BALL et al., 2003).

A variabilidade no comportamento do canal entre isoformas de BK_{Ca} distintas também pode ser em parte devido à modificação pós-tradução diferente, que pode estar subjacente às mudanças na atividade do relaxante uterino. A atividade aumentada dos canais BK_{Ca} na gravidez é muitas vezes devido à fosforilação diferencial em vez de um aumento nos níveis de expressão de BK_{Ca}. A PKG ligada à membrana ativa os canais BK_{Ca} no miométrio humano não-laborioso, contribuindo assim para a quiescência miometrial durante a gestação (BEHRENS, 2000). Nos seres humanos, observou-se aumento dos níveis de canais de BK_{Ca} em grávidas sem trabalho de parto, porém diminuição da expressão do canal de BK_{Ca} no útero pré-termo e de parto, indicando que esses canais podem ser parte do mecanismo para induzir contrações espontâneas durante o trabalho de parto (MATHAROO-BALL et al., 2003; (CHANRACHAKUL et al., 2003). Os miócitos isolados do miométrio humano em trabalho de parto expressam canais BK_{Ca} com baixa sensibilidade ao Ca^{2+} e aos inibidores (KHAN, et al., 1997).

Os SK_{Ca} estão constitutivamente associados a calmodulina, que medeia a abertura do canal através da ligação com o cálcio (XIA et al., 1998). Os canais de

SK_{Ca} emergiram recentemente como reguladores críticos da contratilidade miometrial durante a gestação e o parto. Três isoformas de SK (SK1-3) são produzidas por três genes diferentes (*KCNN1-3*). Eles são todos insensíveis a voltagem e ativados por Ca²⁺ (em torno de 0,1 M) durante o influxo no potencial de ação (KOHLER et al., 1996; XIA et al., 1998). Um papel para os canais de SK_{Ca} na regulação da atividade muscular lisa foi mostrado em uma variedade de preparações (HERRERA et al., 2002; BURNHAN et al., 2002). Os dados referentes aos canais SK no miométrio são limitados. Com base nos dados de reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa, foi sugerida um aumento na regulação da expressão de SK 2 e 3 no útero humano gravídico (sem trabalho de parto) em comparação com amostras de histerectomia não grumosa, embora a proteína do canal não tenha sido medida. A expressão do canal SK3 diminuiu na gestação média em camundongos e o útero de ratos de gestação tardia apresenta isoformas de SK3 menos sensíveis a apamina (MAZZONE et al., 2003).

Um papel funcional para os canais de SK no miométrio de ratos é sugerido por dados de patch clamp de células do miométrio recém-isoladas. A inibição de SK1-3 com apamina e scillatoxina demonstrou claramente que os canais SK contribuíram significativamente para a corrente de saída de K⁺ e para a manutenção do potencial de membrana em repouso. Os dados atuais mostram claramente que os canais SK limitam as contrações espontâneas em útero isolado do rato, embora em menor grau do que os canais K_v (AARONSON et al., 2006).

Esses dados sugerem que a regulação do canal SK pode ser um componente importante no aumento da atividade uterina observada no termo (BROWN et al., 2007; PIERCE et al., 2008). Camundongos transgênicos super-expressando a isoforma 3 dos canais SK_{Ca} (SK3) têm um fenótipo distinto de trabalho comprometido possivelmente devido a contrações de trabalho de parto ineficaz (BOND et al., 2000). No miométrio humano não gravídico e gravídico, a apamina, um inibidor dos canais SK_{Ca}, atenuou o relaxamento induzido por NO (MODZELEWSKA et al., 2003). Estudos recentes demonstraram que a expressão de SK3 deprime as contrações fásicas no útero de rata, limitando o influxo de Ca²⁺ (BROWN et al., 2007).

Os canais K_{ATP} são grandes complexos hetero-octâmeros contendo quatro subunidades da família de canais de K⁺ retificadores internos (Kir6.1 ou Kir6.2) e quatro subunidades SUR da família transportadora ABC: ABCC8 (SUR1) e ABCC9

(SUR2). SUR2 tem duas isoformas diferentes, SUR2A e SUR2B. Ambos os tipos de subunidades, SURs e Kir6.x são necessários para a função do canal. Kir6.x compreende o componente de canal do K_{ATP} , enquanto que os SURs são responsáveis pela sensibilidade ao ATP, propriedades farmacológicas e tráfico deste canal (AGUILAR-BRYAN, 1998; KO, 2008). Os canais K_{ATP} têm estrutura molecular diferente, devido à expressão heteróloga das subunidades Kir6.x e SUR. Isto leva a combinações diferentes e cria diferentes tipos de canais K_{ATP} com propriedades eletrofisiológicas distintas e sensibilidades farmacológicas (LOVASZ et al., 2015).

Este canal é inibido por ATP intracelular e estimulado por ADP, acoplado assim o estado metabólico a alterações na excitabilidade celular (DUNNE; PETERSEN, 1986). A isoforma predominante do miométrio é Kir6.1/SUR2B, embora Kir6.2/SUR1 tenha sido detectada em nível de transcrição (CHIEN et al., 1999; CURLEY, 2002). Estudos já realizados mostram que a expressão desses canais é regulada durante as fases da gravidez. Foi demonstrado que a expressão de SUR1 no miométrio humano foi diminuída no final da gravidez em comparação com mulheres não grávidas. Além disso, os baixos níveis de Kir6.1 e Kir6.2 subunidades foram determinados no final da gestação. A expressão de SUR1 é elevada no início da gravidez e depois diminuiu drasticamente, enquanto que o nível da subunidade SUR2 permaneceu inalterado (LOVASZ et al., 2015). No final da gravidez a expressão de Kir6.1/SUR2B diminuiu, o que poderia facilitar a atividade miometrial intensificada necessária para as contrações do trabalho (CURLEY, 2002). Os baixos níveis de canais K_{ATP} no final da gestação podem facilitar a excitabilidade e contratilidade do miométrio, que é uma das razões para a diminuição da eficácia dos betamiméticos (agonistas β adrenérgicos).

Os canais de K^+ dependentes de voltagem (K_v) são amplamente expressos no músculo liso uterino. Em resposta à despolarização, o efluxo de K^+ através destes canais induz a repolarização dos miócitos liso uterino para o potencial de membrana em repouso (BRAINARD; KOROVIKINA; ENGLAND, 2007). A subfamília do canal K_v que parece desempenhar o papel mais predominante no miométrio durante a gravidez tem sido a subfamília K_v4 . Estudos eletrofisiológicos descreveram a corrente de inativação rápida de K^+ no miométrio grávidico de ratos gerado pela família K_v4 dos canais K^+ . Desta subfamília de canais, $K_v4.2$ e suas subunidades acessórias aumentaram antes do parto, enquanto que a expressão de $K_v4.1$ e $K_v4.3$ diminuiu durante a gestação, sugerindo que fatores solúveis, possivelmente

hormônios, regulam os canais de K_v4 na gravidez (SUZUKI et al., 2005). Estas descobertas sugerem que antes do parto, os níveis elevados de estrogênio aumentam a contratilidade miométrial através da inibição da função dos canais $K_v4.3$. De forma semelhante, em células de miométrio humano cultivadas, o 17β -estradiol, mas não a progesterona, inibiu as correntes geradas pelos K_v , aumentando assim a excitabilidade das membranas (KNOCK et al., 2001).

Os canais K_v4 associam-se a muitas subunidades diferentes, a maioria das quais foram estudadas em tecidos diferentes do miométrio (Yang et al., 2001; BECK et al., 2002). Uma dessas subunidades é o canal K_v de interação com proteínas (KChIPs), que são proteínas de ligação ao Ca^{2+} (AN et al., 2000). Duas isoformas, KChIP2 e 4 foram encontradas no miométrio (SUZUKI et al., 2005). Em ratos, KChIP2 é supra-regulada na gestação tardia e melhora a densidade da membrana celular dos canais K_v4 através do tráfego de canais do retículo endoplasmático para a membrana celular. KChIP também altera a cinética do canal para permitir uma maior corrente do canal K_v4 (AN et al., 2000). As proteínas KChIP podem desempenhar um papel significativo na redução da excitabilidade miométrial e potencializar o amortecimento das contrações uterinas.

Durante a revisão de literatura, não evidenciamos estudos na literatura sobre a classe dos alcaloides quinazolínicos atuando em musculatura lisa uterina, contudo, levando-se em consideração que esses alcaloides possuem um núcleo quinazolínico comum, que a atividade biológica de um composto está intimamente relacionada com sua estrutura química e que esses compostos apresentam grande versatilidade farmacológica, decidiu-se investigar um possível efeito tocolítico de dois alcaloides dihidroquinazolínicos sintéticos em útero isolado de ratas virgens (Figura 1).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Explorar o potencial farmacológico de dois alcaloides dihidroquinazolínicos, RETRO-2 e RETRO-5, obtidos através de síntese orgânica, em musculatura lisa uterina, com a finalidade de descobrir substâncias potencialmente terapêuticas como agentes tocolíticos.

2.2 Específicos

Caracterizar, em nível funcional, o envolvimento dos canais de potássio no mecanismo de ação tocolítico do RETRO-5 em útero de rata dos subtipos:

- a. Canal para K^+ sensível ao Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca});
- b. Canal para K^+ sensível ao Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca});
- c. Canal para K^+ sensível ao ATP (K_{ATP});
- d. Canal para K^+ sensível a voltagem (K_v);
- e. Canal para K^+ retificadores de influxo (K_{ir}).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Produto teste

Foram utilizadas duas substâncias obtidas por síntese orgânica codificadas como RETRO-2 e RETRO-5. Estas foram sintetizadas e cedidas pelo Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues do Departamento de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB. O mesmo era dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) formando uma solução de concentração 10^{-1} M (solução-estoque), que era acondicionada a -20 °C, sendo diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de DMSO nas cubas nunca excedeu 1 % (v/v), sendo assim, desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo.

3.1.2 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens pesando entre 180 e 250g, todas procedentes do Biotério “Prof. Thomas George” do Instituto de Pesquisa em Fármaco e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração tipo *pellets* (Purina) com acesso à água *ad libitum*, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes. Os experimentos serão realizados no período de 08h00 as 20h00.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, sob certidão número 070/2016 (Anexo 1).

3.1.3 Drogas e Reagentes

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3), cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloreto de cálcio bi-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) cloridrato de carbamilcolina (CCh), fosfato monossódico 1-hidrato

(NaH₂PO₄.H₂O) e glicose serão obtidos da Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, EUA). Iberiotoxina (IbTX), cloreto de cézio (CsCl), cloreto de tetraetilamônio (TEA⁺), glibenclamida, apamina, 4-aminopiridina (4-AP), aminofilina e óleo de castor (cremophor®) serão obtidos da Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, EUA).

3.1.4 Solução nutritiva

Foi utilizada solução nutritiva de Tyrode, aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). O pH era ajustado para valores entre 7,2 e 7,4 com solução de HCl ou NaOH (1N) e mantida a temperatura constante de 37 ± 1 °C (LOVASZ et al., 2015). A composição desta solução está descrita a seguir (**Tabela 1**).

Tabela 1. Composição da solução de Tyrode (WALKER, POYSER, 1978).

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	9,2510
KCl	0,2982
CaCl ₂	0,2940
MgCl ₂	0,2134
Glicose	1,0089
NaHCO ₃	0,8401

3.1.5 Equipamentos

Para o registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (10 mL) e conectados a transdutores de força isométricos modelo TRI201AD Panlab (Cornellà, BCN, Espanha) acoplados a um amplificador Quad Bridge modelo Powerlab 4/35 ADInstruments. Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição de dados com o software LabChart® 8 Pro, versão 8.1.2.16 para aquisição e análise dos dados. O sistema continha uma bomba termostática modelo LE 13206 Panlab Harvard Apparatus, que controlava a temperatura das cubas.

Os valores de pH foram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil). As substâncias foram pesadas em balança analítica modelo FA-2104N CETALC (São Paulo, SP, Brasil) e os animais em balança semianalítica GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil).

3.2 Métodos

3.2.1 Investigação do efeito tocolítico do RETRO-2 e RETRO-5 em útero de rata isolado

3.2.1.1 Efeito do RETRO-2 ou RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou KCl 60 mM

As ratas eram tratadas 24 h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Decorrido este tempo, eram eutanasiadas por decapitação usando guilhotina. Após abertura da cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero, colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Tyrode a 37 °C. Em seguida, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro contendo 10 mL da solução Tyrode aeradas com carbogênio durante todo o experimento. Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 40 min antes do contato com qualquer agente, sob tensão de repouso de 1 g, efetuando, neste período, a renovação da solução nutritiva a cada 10 min. Após o período de estabilização, induzia-se uma contração, com ocitocina (10^{-2} UI/mL) ou KCl 60 mM, que era registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital, e sobre o componente tônico eram adicionadas as dihidroquinazolinonas de forma cumulativa (3×10^{-8} – 3×10^{-4} M) às cubas em preparações distintas. O relaxamento produzido foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pela ocitocina e a potência relaxante da substância foi avaliada comparando-se os valores de CE_{50} .

3.2.2 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no mecanismo de ação tocolítico do RETRO-5

3.2.2.1 Efeito do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA⁺) 10 mM

O útero era montado como descrito no item 4.2.1.1. Após o período de estabilização, cada preparação era incubada por 20 min com 10 mM de TEA⁺ (SHUNSUKE, JOELLE 2017), que nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de K⁺. Passado o tempo necessário para o bloqueio desses canais induzia-se uma contração com 10⁻² UI/mL de ocitocina e durante a fase tônica sustentada, O RETRO-5 era adicionado cumulativamente às cubas, em preparações diferentes. O relaxamento produzido pelo RETRO-5 foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pela ocitocina e a potência relaxante da substância foi avaliada comparando-se os valores de CE₅₀ na presença e na ausência do bloqueador.

3.2.2.2 Efeito do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA⁺), 4-aminopiridina (4-AP), cloreto de bário (BaCl₂), glibenclamida e apamina.

O útero era montado como descrito no item 4.2.1.1. O tecido permanecia em repouso por 40 min em contato com a solução de Tyrode. Após este período era induzida uma contração pela adição de 10⁻² UI/mL de ocitocina e sob o componente tônico da contração era adicionando RETRO-5 de forma cumulativa (curva controle). Em outro experimento, era adicionado a outra cuba por 20 min 3 mM de 4-AP, um bloqueador dos canais de potássio abertos por voltagem (K_v) (AARONSON et al., 2006), 3 x 10⁻⁵ M de glibenclamida, um bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997), 100 nM de apamina, um bloqueador seletivo de canais de potássio de pequena condutância ativados pelo Ca²⁺ (SK_{Ca}) (TSAI et al., 1998), 1 mM de TEA⁺, que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos canais de potássio de grande condutância ativados pelo Ca²⁺ (BK_{Ca}) (HUANG, 1998, MURRAY et al., 1991) e BaCl₂ (3 x 10⁻⁵ M por 30 min),

bloqueador seletivo dos K_{ir} . Após esse período uma nova contração pela adição de 10^{-2} UI/mL de ocitocina era induzida na presença desses bloqueadores. Durante a fase tônica sustentada da segunda contração, O RETRO-5 era adicionada cumulativamente à cuba, em preparações diferentes. O relaxamento produzido pelo RETRO-5 foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pela ocitocina e a potência relaxante da substância foi avaliada comparando-se os valores de CE_{50} na presença e na ausência dos bloqueadores.

3.3 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como a média \pm o e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de *Student* não pareado, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

As curvas concentração-resposta foram ajustadas por regressão não-linear descrita pela equação:

$$Y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{((\text{Log}(CE_{50} - X) * S))})$$

Onde “X” é o logaritmo na base 10 da concentração molar da substância testada, “Y” é a resposta relaxante da substância testada em percentagem, “min” é o menor efeito assumido para “Y”, “max” é o maior efeito assumido para “Y” e “S” é o valor da constante de Hill (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003).

A partir dessa equação, foram calculados os valores de CE_{50} (concentração molar de uma substância em que ela é capaz de causar 50% de seu efeito máximo), servindo como parâmetro de potência relativa de uma substância, e o E_{\max} (valor médio, em percentagem, do efeito máximo obtido por uma substância em relação ao maior valor possível num dado tecido), servindo como parâmetro de eficácia relativa entre duas substâncias (NEUBIG et al., 2003).

4 RESULTADOS

4.1 Investigação do efeito tocolítico do RETRO-2 e RETRO-5 em útero isolado de rata

4.1.1 Efeito do RETRO-2 e RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina

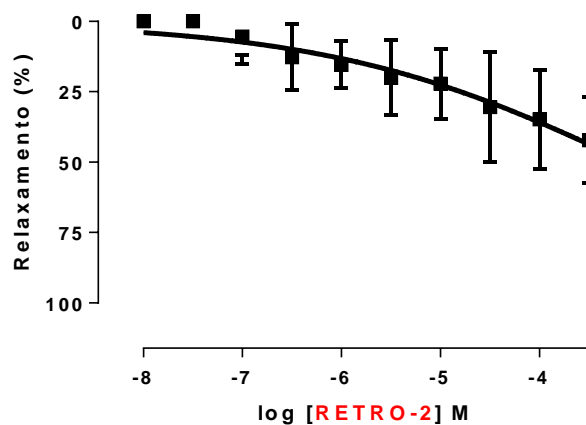
O RETRO-2 (10^{-8} a 3×10^{-4} M) induziu relaxamento de maneira significativa no útero pré-contraído com ocitocina 10^{-2} UI/mL, mas não de forma satisfatória, uma vez que na concentração máxima utilizada neste trabalho sua eficácia foi de apenas $E_{\max} = 42,3 \pm 6,8\%$ ($n = 5$) (Figura 5A).

Por outro lado, o RETRO-5 (10^{-8} a 3×10^{-4} M) relaxou o útero pré-contraído por 10^{-2} UI/mL de ocitocina de maneira significativa e dependente de concentração ($CE_{50} = 2,4 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M, $R^2 = 0,9454 \pm 0,09$), com eficácia máxima (E_{\max}) de $99,3 \pm 0,4\%$ ($n = 5$) (Figura 5B). Os valores de CE_{50} demonstram uma maior potência e eficácia do RETRO-5 em relaxar as tiras uterinas contraídas com ocitocina.

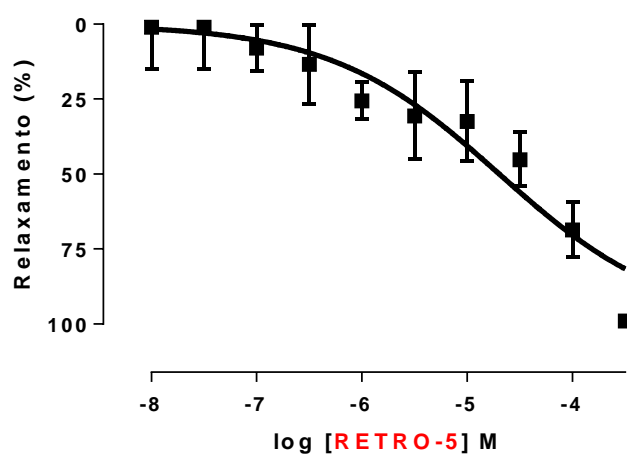
Em até 1 h após a retirada das dihidroquinazolidonas da cuba, os mesmos agentes contráteis produziram contrações com a mesma amplitude em relação à contração inicial, indicando que o efeito dessas substâncias é reversível neste órgão e nas condições testadas (dados não mostrados).

Figura 5 - Efeito tocolítico do RETRO-2 (A) e RETRO-5 (B) sobre as contrações tônicas induzidas 10^{-2} UI/mL M de ocitocina, em útero isolado de rata, n = 5.

A



B

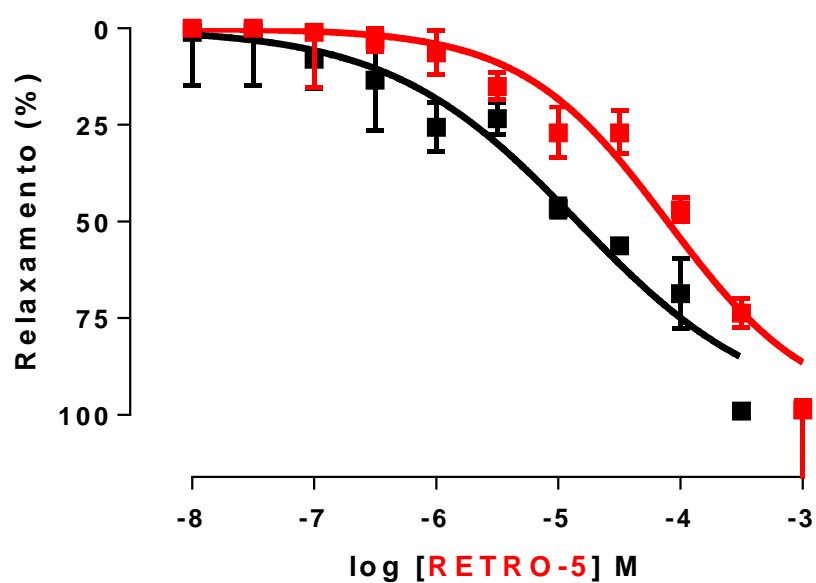


Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado.

4.1.2 Efeito tocolítico do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl em útero isolado de rata

O RETRO-5 (10^{-8} a 3×10^{-4} M), adicionado de maneira cumulativa a cuba, relaxou o útero de rata pré-contraído com elevadas concentrações de KCl (60 mM) ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,1 \times 10^{-4}$ M, $n = 3$), com eficácia máxima (E_{max}) de $98,6 \pm 1,3\%$. A potência relaxante do RETRO-5 ($CE_{50} 2,4 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M, $n = 5$) foi reduzida cerca de 4,5 vezes ($p < 0,0013$) quando comparada ao relaxamento induzido pelo alcaloide quando o útero era pré-contraído por elevadas concentrações (60 mM) de KCl, como podemos observar pelos valores de CE_{50} que diferem estatisticamente entre si (Figura 6).

Figura 6 - Efeito tocolítico RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL M de ocitocina (■) ou 60 mM de KCl (■), em útero isolado de rata. n=5.

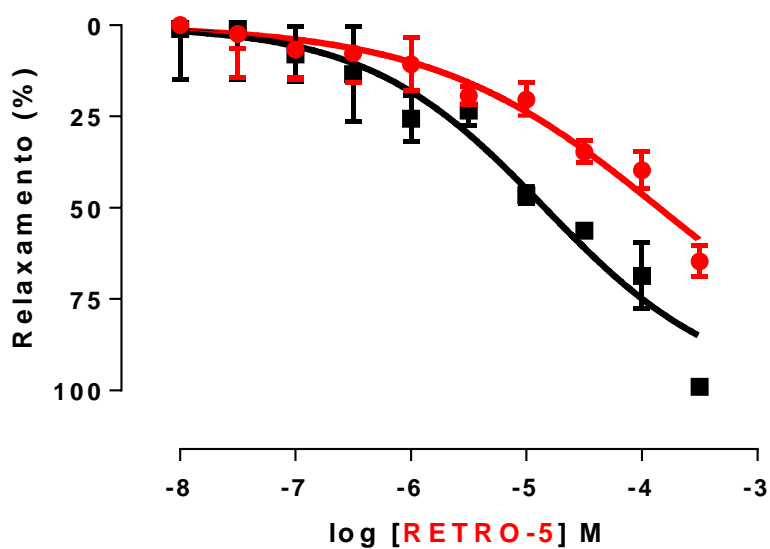


Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.1.3 Efeito do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA⁺) 10 mM

O RETRO-5 (10^{-8} – 3×10^{-4} M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência (curva controle) (CE_{50} $2,4 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M, $n = 5$) e na presença ($CE_{50} = 1,5 \pm 0,6 \times 10^{-4}$ M, $n = 3$) de 10 mM de TEA⁺, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (Figura 7). A potência relaxante do RETRO-5 foi reduzida cerca de 6,25 vezes significativamente ($p < 0,0001$) quando comparada ao relaxamento produzido pela substância na ausência de TEA⁺. Além disso, na presença do bloqueador o valor do E_{max} foi reduzido para $66,0 \pm 2,1\%$ (Figura 7, Tabela 2).

Figura 7 - Efeito tocolítico do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL M de ocitocina na ausência (■) ou na presença de TEA⁺ 10 mM (●), em útero isolado de rata. n=3.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.1.4 Efeito do RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio

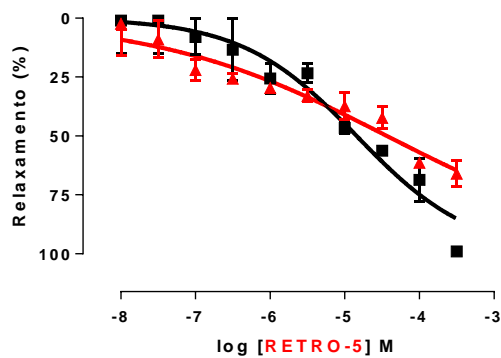
O RETRO-5 (10^{-8} a 3×10^{-4} M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência (curva controle) ($CE_{50} 2,4 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M, $n = 5$) e na presença de 3 mM de 4-AP (bloqueador seletivo dos K_V), 3×10^{-5} M de glibenclamida (bloqueador seletivo dos K_{ATP}), 1 mM de TEA^+ (bloqueador seletivo dos BK_{Ca}), 10^{-7} M de apamina (bloqueador seletivo dos SK_{Ca}) e 3×10^{-5} M de $BaCl_2$ (bloqueador seletivos dos K_{ir}).

Na presença de 1 mM de TEA^+ ($CE_{50} = 3,6 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ M, $n = 3$), de 3×10^{-5} M de $BaCl_2$ ($CE_{50} = 4,3 \pm 1,9 \times 10^{-5}$ M, $n = 3$) e 3 mM de 4-AP ($CE_{50} = 6,4 \pm 1,1 \times 10^{-5}$ M, $n = 3$) a curva de relaxamento do RETRO-5 em útero isolado de rata pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina não foi alterada, como podemos observar pelos valores de CE_{50} que não apresentam diferença significativa entre si (Figura 8, Tabela 2).

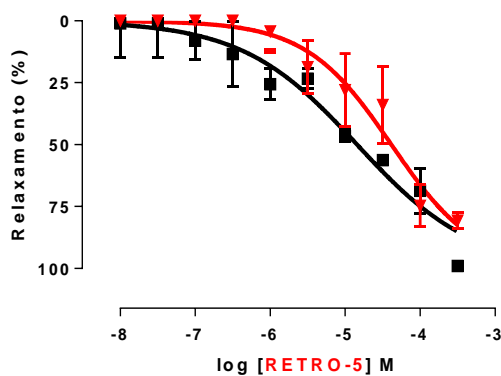
Por outro lado, na presença de 10^{-7} M de apamina ($E_{max} = 18,4 \pm 4\%$, $n = 3$) e 3×10^{-5} M de glibenclamida ($CE_{50} = 1,6 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M, $n = 3$) a curva de relaxamento do RETRO-5 foi desviada para a direita de maneira significativa, com sua potência atenuada de maneira significativa cerca de 6,6 vezes na presença de glibenclamida e apresentando um E_{max} de $18,4 \pm 4\%$ na presença de apamina, praticamente abolindo a curva de relaxamento. (Figura 8, Tabela 2).

Figura 8 - Efeito tocolítico RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL M de ocitocina na ausência (■) ou na presença de 1 mM TEA⁺ (▲) (A), na presença de 3×10^{-5} de BaCl₂ (▼) (B), na presença de 4-AP (○) (C) em útero isolado de rata. n=3.

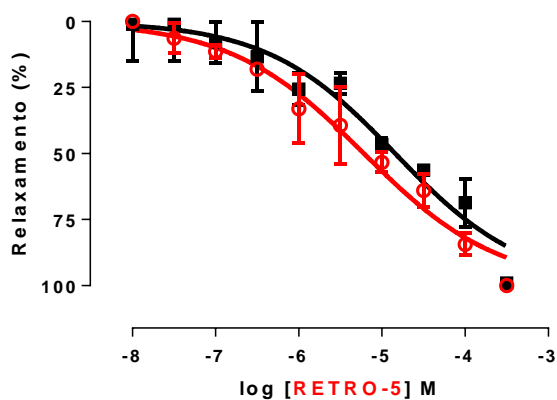
A



B



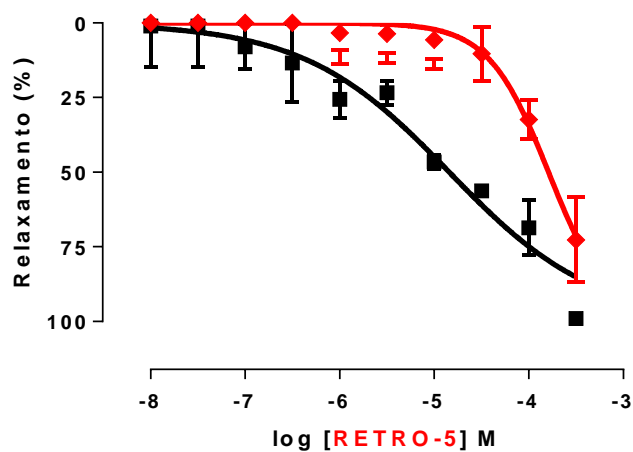
C



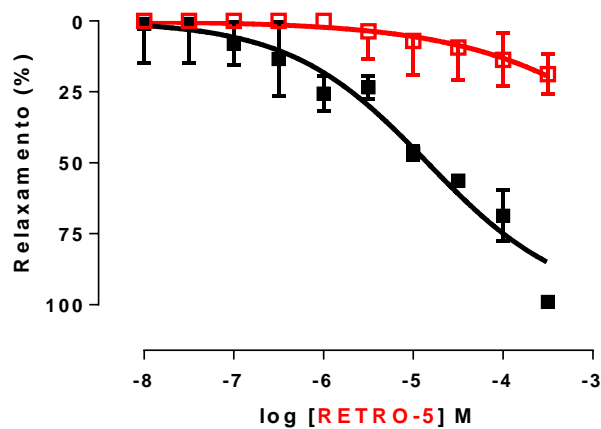
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

Figura 9 - Efeito tocolítico RETRO-5 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL M de ocitocina na ausência (■) ou na presença de glibenclamida (♦) (A) ou na presença de apamina (□) (B) em útero isolado de rata. n=3.

A



B



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

Tabela 2 – Valores CE_{50} (M) e E_{max} (%) do RETRO-5 na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais de potássio em útero de rata isolado.

Condição Experimental	CE_{50} (M)	E_{max} (%)
Controle	$2,4 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M	$99,0 \pm 0,4$
TEA ⁺ 10 mM	$1,5 \pm 0,6 \times 10^{-4}$ M *	$98,6 \pm 1,3$
TEA ⁺ 1 mM	$3,6 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ M	$66,6 \pm 3,0$
BaCl ₂	$4,3 \pm 1,9 \times 10^{-5}$ M	$80,7 \pm 2,0$
4-AP	$6,4 \pm 1,1 \times 10^{-5}$ M	100,0
Glibenclamida	$1,6 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M **	$72,4 \pm 8,0$
Apamina	-	$18,4 \pm 4,0$

Teste *t*, não pareado, * $p < 0,0001$, ** $p < 0,05$ (controle vs. bloqueadores).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi investigado o efeito tocolítico dos alcaloides dihidroquinazolínicos sintéticos RETRO-2 e RETRO-5. Demonstrou-se que o RETRO-5 possui um efeito tocolítico em útero isolado de ratas virgens, sendo esse efeito, em parte, exercido por meio da modulação positiva dos canais de potássio, dos subtipos K_{ATP} e SK_{Ca} .

Partindo-se do princípio que os efeitos de uma molécula bioativa estão diretamente relacionados com sua estrutura, e que esses alcaloides compartilham de um núcleo quinazolínicos básico, decidiu-se investigar um possível efeito tocolítico das RETRO-2 e RETRO-5 em músculo liso uterino de ratas virgens. Nos ensaios farmacológicos iniciais O RETRO-2 não foi potencialmente capaz de induzir relaxamento - de forma satisfatória - nas tiras uterinas pré-contraídas com ocitocina (10^{-2} UI/mL), enquanto que O RETRO-5 foi capaz de exercer um efeito de maneira significativa, dependente de concentração e com eficácia máxima. Com o intuito de elucidar em nível funcional o mecanismo de ação pelo qual o RETRO-5 exerce seu efeito tocolítico, alguns ensaios farmacológicos foram realizados.

A contração do músculo liso é disparada principalmente pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$, e pode ser alcançada tanto via despolarização de membrana, levando ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$ através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), como pela ligação do agonista a um receptor, que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003), originalmente designados por acoplamentos eletromecânico e fármaco-mecânico, respectivamente (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Agonistas como a ocitocina ligam-se a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata de fosfoinositídeos, usualmente através da produção de IP_3 mediada pelas proteínas G_q e G_{11} , estimulando, assim a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas contráteis podem também elevar a $[Ca^{2+}]_i$ através de receptores de rianodina e estimular a entrada de Ca^{2+} através de múltiplos canais (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002).

Em músculo liso, vários agonistas causam uma resposta contrátil bifásica, consistindo em uma contração inicial transiente – componente fásico (< 30 s), seguido por uma contração sustentada – componente tônico, que se desenvolve lentamente ao longo de 15 min e é mantida durante o período de exposição ao

agente contrátil (VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979).

Baseado nessa premissa resolveu-se verificar se o RETRO-5 promoveriam o relaxamento do útero pré-contraído com ocitocina (acoplamento misto - fármaco e eletromecânico) ou KCl (acoplamento eletromecânico).

Um protocolo experimental que se baseia nas propriedades eletroquímicas da membrana celular é através de elevações (60 mM) da concentração de K^+ extracelular, que reduz de maneira significativa o gradiente eletroquímico e consequente efluxo desse íon, promovendo uma grande despolarização, suficiente para abrir uma grande quantidade de Cav (GURNEY, 1994). Dessa forma, moduladores positivos de canais de K^+ apresentam dificuldade em promover seu efeito relaxante em condições de aumento da concentração externa de K^+ . (GURNEY, 1994; NELSON, 1995).

Como mostra a Fig. 6 o RETRO-5 relaxou de maneira significativa e dependente de concentração o útero pré-contraído com 60 mM de KCl, no entanto sua potência relaxante foi atenuada, sugerindo uma modulação positiva de canais de potássio, não descartando a participação de canais de Ca^{2+} uma vez que sua eficácia foi máxima.

Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração do músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon K^+ , levando a uma hiperpolarização/repolarização, e a diminuição da condutância ao K^+ , levando a uma despolarização (KNOT et al., 1996), logo substâncias que ativem os canais de K^+ podem ser uma alternativa farmacológica em potencial para distúrbios relacionados a contração anormal dos músculos lisos, como parto pré-maturo e dismenorreia. O efluxo de potássio em células miométriais resulta em repolarização de membrana e este efluxo é a corrente iônica primária responsável pela manutenção do potencial de repouso no útero. No músculo liso uterino, os mais abundantes e mais bem estudados canais de K^+ são: K_V ; BK_{Ca} ; SK_{Ca} ; K_{ATP} e K_{ir} (BRAINARD; KOROVIKINA; ENGLAND, 2007). Com a finalidade de investigar se o RETRO-5 estaria atuando como um abridor dos canais de K^+ utilizou-se bloqueadores desses canais como ferramentas farmacológicas.

Para a evidência de que o RETRO-5 estaria modulando positivamente canais de K^+ para exercer seu efeito relaxante em útero de rata, utilizou-se como

ferramenta farmacológica o TEA⁺, que na concentração de 10 mM é um bloqueador não seletivo desses canais (NIU et al., 2008). Observou-se que a curva de relaxamento obtida para o RETRO-5 foi deslocada para a direita na presença do bloqueador, com redução da potência relaxante em cerca de 6,6 vezes (Figura 7, Tabela 2). Sugerindo assim a participação desses canais no efeito relaxante da substância.

Os BK_{Ca} (também conhecidos como maxi-K) são canais K⁺ de grande condutância, sensíveis ao Ca²⁺ e a voltagem. Eles são um dos canais de íons mais extensamente estudados no músculo liso uterino devido à sua abundância e corrente repolarizante significativa. Relativamente poucos canais BK_{Ca} precisam ser ativados para produzir relaxamento uterino. Assim, esses canais podem ter efeitos profundos na atividade miometrial. Em miócitos uterinos não grávidos os canais BK_{Ca} contribuem com aproximadamente 35% da corrente repolarizante de K⁺ (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007). Os canais BK_{Ca} mediam o relaxamento uterino em resposta à ativação da ciclase de adenilil (AC), que está mais expressa na meia gestação do que na gestação tardia. (OKAWA et al., 2000). Uma vez que estes canais têm maior participação na manutenção do potencial de repouso do miócito uterino criou-se a hipótese de que eles poderiam estar participando do mecanismo de ação tocolítico do RETRO-5. Para se investigar o dihidroquinazolinona estaria agindo sobre os BK_{Ca}, ativando-os, e conseqüentemente levando a uma repolarização de membrana que acarretaria indiretamente ao fechamento dos Ca_v, utilizou-se o TEA⁺ 1 mM, que é uma concentração específica para bloquear apenas os BK_{Ca} (LATORRE et al., 1989; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Na presença do bloqueador a curva de relaxamento promovida pelo RETRO-5 não teve sua potência alterada. Estes dados demonstram que provavelmente o relaxamento produzido pelo dihidroquinazolinona em útero isolado de rata não está associado a modulação positiva dos BK_{Ca} (Figura 8ª, Tabela 2).

Os canais K_{ir} estão presentes numa grande variedade de células excitáveis e não excitáveis, incluindo células de músculo liso uterino. Este tipo de canal de potássio caracteriza-se por apresentar sempre um influxo de íons K⁺ superior à saída para qualquer valor de voltagem. A atividade destes canais depende da hiperpolarização, da despolarização e também da concentração extracelular de K⁺. (NELSON; QUAYLE, 1995; JACKSON, 2000). Embora a corrente K⁺ para fora da

célula pelos K_{ir} seja pequena, em condições fisiológicas o potencial de membrana da célula é positivo em relação ao potencial de equilíbrio do K^+ , o que gera um gradiente eletroquímico, levando o potássio a sair da célula por difusão passiva (NELSON; QUAYLE, 1995; JACKSON, 2000). A participação desses canais no efeito relaxante do RETRO-5 foi avaliada utilizando-se um bloqueador seletivo, o $BaCl_2$ (ANDERSSON et al., 2000; TEP-AREENAN; KENDALL; RANDALL, 2003). A potência relaxante do RETRO-5 não foi alterada na presença de 3×10^{-5} M de $BaCl_2$, sugerindo que os K_{ir} não participa do mecanismo de ação dessa molécula (Figura 8B, Tabela 2).

Os canais de K^+ dependentes de voltagem (K_v) são amplamente expressos no músculo liso uterino. Em resposta à despolarização, o efluxo de K^+ através destes canais induz a repolarização dos miócitos lisos uterinos para o potencial de membrana em repouso (BRAINARD; KOROVIKINA; ENGLAND, 2007). Diante disso criou-se uma hipótese de que o RETRO-5 poderia estar induzindo o efeito tocolítico por ativação dos K_v que ao repolarizar a membrana levaria indiretamente ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} via Cav e por fim ao relaxamento muscular liso. Para confirmar ou descartar essa hipótese, resolveu-se avaliar o efeito relaxante do RETRO-5 na presença e na ausência da 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_v , e o observado foi que em nível funcional esses canais não participam do efeito relaxante dessa substância (Figura 8C, Tabela 2).

Os canais K_{ATP} são grandes complexos hetero-octâmeros contendo quatro subunidades da família de canais K^+ retificadores internos ($Kir6.x$: ou $Kir6.1$ ou $Kir6.2$) e quatro subunidades SUR da família transportadora ABC: ABCC8 (SUR1) e ABCC9 (SUR2). SUR2 tem duas isoformas diferentes, SUR2A e SUR2B, que são variantes de emenda. Ambos os tipos de subunidades, SURs e $Kir6.x$ são necessários para a função de canal. $Kir6.x$ compreende o componente de canal do K_{ATP} , enquanto que os SURs são responsáveis pela sensibilidade ao ATP, propriedades farmacológicas e tráfico deste canal (AGUILAR-BRYAN, 1998; KO, 2008). Uma característica primária destes canais é a de sua abertura ser inibida por concentrações basais de ATP intracelular, por sulfoniluréias e por baixas concentrações de Ba^{2+} (STANDEN et al., 1989; SANBORN, 2000). No entanto, hoje se sabe que existem subtipos de K_{ATP} que são relativamente insensíveis aos níveis basais de ATP, mas são bloqueados seletivamente pela glibenclamida do mesmo modo que os demais (MISHRA; AARONSON, 1999). A isoforma predominante do

miotrio é Kir6.1/SUR2B, embora Kir6.2/SUR1 tenha sido detectada em nível de transcrição (CHIEN et al., 1999; CURLEY, 2002). Os ativadores dos K_{ATP} diminuem as contrações uterinas, no entanto, eles são mais potentes em miométrio humano não grávidico do que em grávidico (SANBORN, 2000). Para avaliar se os K_{ATP} estariam participando do mecanismo de ação tocolítico do RETRO-5 em útero isolado de rata, avaliou-se o efeito do dihidroquinazolinona na presença de glibenclamida, inibidor seletivo destes canais, e observou-se que a potência relaxante foi atenuada e seu efeito máximo reduzido, sugerindo que estes canais têm participação no mecanismo relaxante do RETRO-5 (Figura 9A).

Os canais de potássio sensíveis ao cálcio de pequena condutância, SK_{Ca} , emergiram recentemente como reguladores críticos da contratilidade miometrial durante a gestação e o parto. Camundongos transgênicos sobre-expressando a isoforma 3 dos canais SK_{Ca} ($SK3$) têm um fenótipo distinto de trabalho comprometido possivelmente devido a contrações de trabalho ineficaz (BOND et al., 2000). No miométrio humano não grávidico e grávidico, a apamina, um inibidor dos canais SK_{Ca} , atenuou o relaxamento induzido por NO (MODZELEWSKA et al., 2003). Para avaliar uma possível participação dos SK_{Ca} no efeito tocolítico induzido pelo RETRO-5, observamos o relaxamento na presença de apamina (AP), um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} . Caso essa hipótese fosse verdadeira o relaxamento do útero de rata induzido pelo dihidroquinazolinona deveria ser atenuado na presença de apamina. Como podemos observar na Fig. 9B e tabela 2 o efeito relaxante do RETRO-5 foi praticamente abolido na presença deste bloqueador, sugerindo o um papel protagonista desses canais no efeito tocolítico dessa molécula.

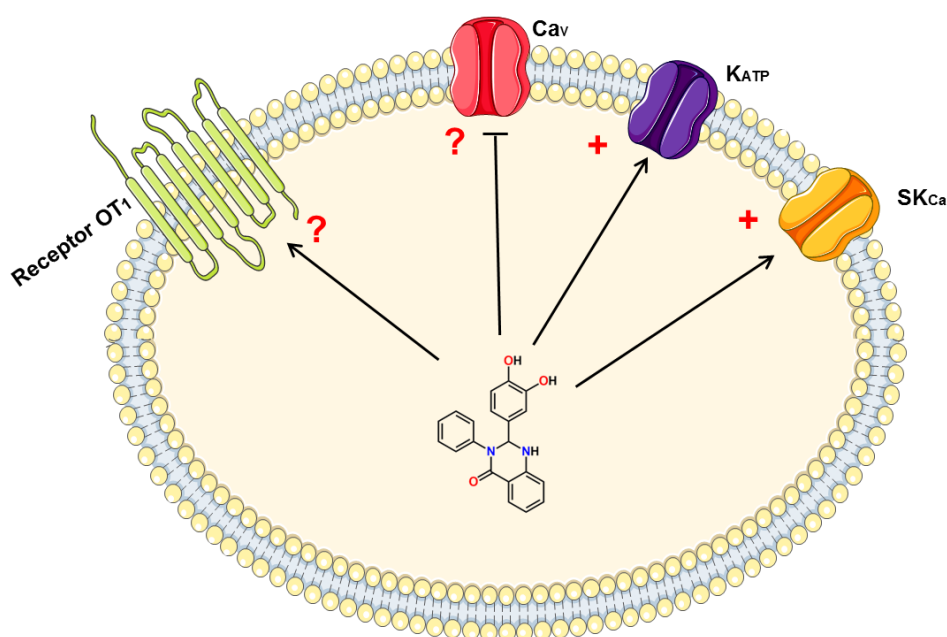
Diante desses dados, em nível funcional, podemos sugerir que o mecanismo de ação para o efeito tocolítico do RETRO-5 envolve a modulação positiva de canais de K^+ dos subtipos K_{ATP} e SK_{Ca} , que culmina com o fechamento indireto dos canais Cav , resultando em um menor influxo de Ca^{2+} e consequente relaxamento do útero isolado de rata.

Não podemos descartar outras vias, ainda não investigadas, e que podem ter um grande papel no efeito tocolítico do RETRO-5 sobre o músculo liso uterino, ainda sendo necessárias futuras investigações para a obtenção de uma visão total do mecanismo de ação pelo qual essa molécula exerce seus efeitos.

6 CONCLUSÕES

No estudo do efeito tocolítico dos dihidroquinazolinonas sintéticas (RETRO-2 e RETRO-5), visando avaliar a participação dos canais de potássio no seu mecanismo de ação, pode-se concluir que:

1. Tanto o RETRO-2 como a RETRO-5 apresentaram efeito tocolítico significativo em útero isolado de rata, sendo o RETRO-5 mais potente e eficaz.
2. RETRO-5 relaxou de maneira significativa e concentração-dependente o útero contraído tanto por ocitocina quanto por KCl.
3. O RETRO-5 modula positivamente canais de K^+ dos subtipos, SK_{Ca} e K_{ATP} para exercer seu efeito tocolítico.
4. Não se podem descartar outras vias de sinalização que ainda não foram investigadas, como o antagonismo dos receptores OT_1 bem como a modulação negativa dos Cav .



Fonte: Autor (2017).

REFERÊNCIAS

AARONSON, P. I.; SARWAR, U.; GIN, S.; ROCKENBAUCH, U.; CONNOLLY, M.; TILLET, A.; WATSON, S.; LIU, B.; TRIBE, R. M. A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 147, p. 815–824. 2006.

ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sciences**, v. 45, p. 757-786, 1989.

AGUILAR-BRYAN, L.; CLEMENT, J.P.T.; GONZALEZ, G.; KUNJILWAR, K.; BABENKO, A.; BRYAN, J. Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. **Physiological Reviews**, v. 78 n.1, p.227-245.1998

AGUILLAR, H. N.; MITCHELL, B. F.. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**. [s.l.], v. 16, n. 6, p.725-744, 14 jun. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmq016>.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. **Journal of Anesthesia**, v. 21, p.232-42. 2007.

ANDRADE, D.M.L. Avaliação da atividade antioxidante, hipotensora e vasodilatadora da Jabuticaba, *Myrciaria cauliflora* Berg. **Dissertação de Mestrado**, p. 20 – 32, 2014.

AN, W. F.; BOWLBY, M. R.; BETTY, M.; CAO, J.; LING, H.P.; MENDOZA, G.; et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. **Nature**, [s.l.], v. 403, n. 6769, p.553-556, 3 fev. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/35000592>.

ASOKAN, K. T.; SARKAR, S.; MISHRA, S.; RAVIPRAKASH, V. Effects of mibefradil on uterine contractility. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 455, n. 1, p.65-71, nov. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)02487-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02487-1).

BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**. Artmed, Porto Alegre, 2001.

BECK, E. J.; BOWLBY, M.; AN, W. F.; RHODES, K. J.; COVARRUBIAS, M. Remodelling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein. **The Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 538, n. 3, p.691-706, fev. 2002. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013127>.

BEHRENS, R.; NOLTING, A.; REIMANN, F.; SCHWARZ, M.; WALDSCHUTZ, R.; PONGS, O. HKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel β subunit family. **Febs Letters**, [s.l.], v. 474, n. 1, p.99-106, 23 maio 2000. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01584-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01584-2).

BERGILLOS F. G.; RIVAS, M. A.. Lesiones por picaduras y mordeduras de animales. **Toxicología clínica**, [s.l.] , v. 2. 2013

BERKMAN, N. D.; THORP, J. M.; Jr., LOHR, K. N.; CAREY, T. S.; HARTMANN, K. E.; GAVIN, N. I.; HASSELBLAD, V.; IDICULA, A.E. Tocolytic treatment for the management of preterm labor: A review of the evidence. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 188, n. 6, p.1648-1659, jun. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1067/mob.2003.356>.

BHADRA, K. KUMAR, G. S. Therapeutic Potential of Nucleic Acid-binding Isoquinoline Alkaloids: Binding Aspects and Implications for Drug Design. **Medicinal Research Reviews**, v.31, n.6 p.821-862, 2011

BLANKS, A.M.; ZHAO, Z.H.; SHMYGOL, A.; BRU-MERCIER, G.; ASTLE, S.; THORNTON, S. Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. **The Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 581, n. 3, p.915-926, 6 jun. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2007.132126>

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, p. 289 - 330, 1989.

BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BOND, C. T.; SPRENGEL, R.; BISSONNETTE, J. M.; KAUFMANN, W.A.; PRIBNOW, D.; NEELANDS, T.; et al. Respiration and Parturition Affected by

Conditional Overexpression of the Ca^{2+} -Activated K^+ Channel Subunit, SK3. **Science**, [s.l.], v. 289, n. 5486, p.1942-1946, 15 set. 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.289.5486.1942>.

BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K.. Potassium channels and uterine function. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.332-339, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.05.008>.

BROWN, A.; CORNWELL, T.; KORNIYENKO, I.; SOLODUSHKO, V.; BOND, C.T.; ADELMAN, J.P.; et al. Myometrial Expression of Small Conductance Ca^{2+} -activated K^+ (SK3) Channels Depresses Phasic Uterine Contraction. *Ajp: Cell Physiology*, [s.l.], p.832-840, 21 fev. 2006. **American Physiological Society**. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00268.2006>.

BURSZTYN, L.; EYTAN, O.; JAFFA, A, J.; ELAD, D. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, p. 289 - 330, 1989.

BURSZTYN, L. et al. Modeling Myometrial Smooth Muscle Contraction. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1101, n. 1, p.110-138, 15 fev. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1389.025>.

CHANRACHAKUL, B.; MATHAROO-BALL, B.; TURNER, A. et al. Immunolocalization and protein expression of the alpha subunit of the large-conductance calcium-activated potassium channel in human myometrium. **Reproduction**, [s.l.], v. 126, n. 1, p.43-48, 1 jul. 2003. BioScientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1260043>.

CHIEN, E. K.; ZHANG, Y.; FURUTA, H.; HARA, M. Expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues: Overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonyleurea-binding regulatory subunit 2. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 180, n. 5, p.1121-1126, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378\(99\)70604-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378(99)70604-6).

CRETOIU, D.; CIONTEA, S. M.; POPESCU, L.M.; CEAFALAN, L.; ARDELEANU, C. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) as steroid hormone sensors in human myometrium: immunocytochemical approach. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.789-795, jul. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00438.x>.

CURLEY, M.; CAIRNS, M. T.; FRIEL, A. M.; McMEEL, O. M.; MORRISON, J.J.; SMITH, T.J.; Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium. **Molecular Human Reproduction**, v.8, p.941–5. 2002

CURRÒ, D. Ion channels as therapeutic targets, part B -Chapter Seven – The Modulation of Potassium Channels in the Smooth Muscle as a Therapeutic Strategy for Disorders of the Gastrointestinal Tract. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. v 104, p.263-265, 2016

DANTAS, B. B. Avaliação do efeito anticâncer de compostos sintéticos derivados do núcleo tetraidropirano. 2014. 100f. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia)** – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2014.

DALRYMPLE, A.; SLATER, D.M.; BEECH, D. POSTON, L.; TRIBE, R.M. Molecular identification and localization of Trp homologues, putative calcium channels, in pregnant human uterus. *Molecular Human Reproduction*, [s.l.], v. 8, n. 10, p.946-951, 1 out. 2002. **Oxford University Press** (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/8.10.946>.

DUNNE, M. J.; PETERSEN, O. H. Intracellular ADP activates K⁺ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. **Febs Letters**, [s.l.], v. 208, n. 1, p.59-62, 10 nov. 1986. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81532-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(86)81532-0).

EXTON, J. H. New Developments in phospholipase D. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 15579-15582, 1997.

FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D.J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, S(-)-Bay K8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, v. 158, n. 1, p. 149-154, 1989.

FORMAN, A.; ANDERSSON, K-E.; MAIGAARD, S. Effects of Calcium Channel Blockers on the Female Genital Tract. **Acta Pharmacologica Et Toxicologica**, [s.l.], v. 58, n. 2, p.183-192, 13 mar. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0773.1986.tb02535.x>.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho–Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.

GARFIELD, R.E.; ALI, M.; YALLAMPALLI, C.; IZUMI, H. Role of gap junctions and nitric oxide in control of myometrial contractility. **Seminars in Perinatology**. 1995, vol. 1 (pg. 41-51)

GARFIELD, R, E.; MANER, W. L. Physiology and electrical activity of uterine contractions. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.289-295, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2007.05.004>.

GARFIELD, R.E.; SIMS, S.M.; KANNAN, M.S.; DANIEL, E.E. Possible role of gap junctions in activation of myometrium during parturition. **American Journal of Physiology**. 1978, vol. 5 (pg. C168-C179).

GASPAR, R. et al. Pregnancy-induced decrease in the relaxant effect of terbutaline in the late-pregnant rat myometrium: role of G-protein activation and progesterone. **Reproduction**, [s.l.], v. 130, n. 1, p.113-122, 28 jun. 2005. BioScientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00490>.

GHERGHICEANU, M.; POPESCU, L. M. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human resting mammary gland stroma. Transmission electron microscope (TEM) identification. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 9: 893–910. 2005. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00387.x

GIBB W.; CHALLIS J.R. Mechanisms of term and preterm birth. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**. 2002;24:855–860.

GNUS, J.; CZERSKI, A.; FERENC, S.; ZAWADZKI, W.; WITKIEWICZ, W.; RUSIECKA, A.; BUJOK, J.; HAUZER, W.; JANECEK, M.; CHRÓSZCZ, A. Role of $\alpha 1$ -adrenergic receptor subtypes in contractility of the rabbit abdominal aorta in vitro. **Acta Veterinaria Brno**, v. 82, p. 331-36. 2013.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 18-20, p. 894-901, 2008.

HELGUERA, G.; OLCESSE, R.; SONG, M.; TORO, L.; STEFANI, E. Tissue-specific regulation of Ca^{2+} channel protein expression by sex hormones. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.59–66, 2002

HERRERA, G.M., NELSON, M.T. Differential regulation of SK and BK channels by Ca^{2+} signals from Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes, **J. Physiol**. 541 (2002) 483–492

HIRATA, S.; ENOKI, T.; KITAMURA, R.; VINH, V. H.; NAKAMURA, K.; MORI, K. Effects of isofurane on receptor-operated Ca^{2+} channels in rat aortic smooth muscle. **British Journal of Anaesthesia**, v. 81, p.578-83. 1998.

HINESCU, M. E.; POPESCU, L. M.. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human atrial myocardium. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.972-975, out. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00394.x>.

HOFMANN, F.; FEIL, R.; KLEPPISCH, T.; SCHLOSSMANN, J. Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 1–23, 2006.

HOLDA J. R.; OBERTI, C.; PEREZ-REYES, E.; BLATTER, L. A Characterization of an oxytocin-induced rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in single human myometrium smooth muscle cells. **Cell Calcium**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.43-51, jul. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0143-4160\(96\)90049-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0143-4160(96)90049-4).

HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **General Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

HUANG, Y. Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K^+ channel blockers in rat aortic rings. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, n. 1, p. 53-60, 1998.

HUGHEST, S. J.; HOLLINGSWORTH, M. Relaxin as a Relaxant of the Isolated Rat Uterus: Comparison with Its Mechanism of Action In Vivo. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 829-833. 1997.

HUIZINGA, J.D.; LAMMERS, W.J. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms, **American Journal of Physiology-Gastrointestinal**. vol. 1, p. 1-8. 2009.

HINESCU, M. E.; GHERGHICEANU, M.; MANDACHE, E.; CIONTEA, S. M.; POPESCU, L. M. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.243-257, jan. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00306.x>.

HINESCU, M. E.; ARDELEANU C.; GHERGHICEANU. M.; POPESCU L.M.; Interstitial Cajal-like cells in human gallbladder, **Journal of Molecular Histology**, 2007, vol.38 n. 4, p. 275-284. 2007.

HINESCU, M.E.; POPESCU, L.M.; GHERGHICEANU, M.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S. Interstitial Cajal-like cells in rat mesentery: an ultrastructural and immunohistochemical approach. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine* , , vol. 1, p. 260-270. 2008

HOFMANN, F.; FEIL, R.; KLEPPISCH, T.; SCHLOSSMANN, J. Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 1–23, 2006.

INOUE, Y.; SPERELAKIS, N. Gestational change in Na⁺ and Ca²⁺ channel current densities in rat myometrial smooth muscle cells, **American Journal of Physiology**. 1991, vol. 3, p. 658-C663

IJLAND, M. M. et al. Endometrial wavelike movements during the menstrual cycle. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 65, n. 4, p.746-749, abr. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)58207-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(16)58207-7).

JENNIFER, B.S.; THOMAS, A. J.; IAIN, A.G. KV7 potassium channels: a new therapeutic target in smooth muscle disorders. **Drug Discovey today**, v. 19, n.4, p. 1-3. 5-8, 2014.

JENNIFER, M. H; KENNETH, L. B. Novel treatment strategies for smooth muscle disorders: Targeting Kv7 potassium channels. **Pharmacology & Therapeutics**, 2016. doi: 10.1016 / j.pharmthera.2016.05.002

KHAN, R. N., MATHAROO-BALL, B., ARULKUMARAN, S., ASHFORD, M. L. J.: Potassium channel in the human myometrium. **Experimental Physiology**, [s.l.], v. 86, n. 2, p.255-264, mar. 2001. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1113/eph8602181>.

KHAN, R.N.; SMITH, S.K.; MORRISON, J.J.; ASHFORD, M.L. Ca²⁺ dependence and pharmacology of large-conductance K⁺ channels in nonlabor and labor human uterine myocytes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, 1 November 1997, Vol. 273, n. 5, C1721-C1731.

KNOCK, G. A.; TRIBE, R. M.; HASSONI, A. A.; AARONSON, P. I. Modulation of Potassium Current Characteristics in Human Myometrial Smooth Muscle by 17β-

Estradiol and Progesterone1. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 64, n. 5, p.1526-1534, 1 maio 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1526>.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego, Academic Press, 203-219, 1996.

KO, E. A.; HAH, J.; JUNG, I.D.; PARK, W.S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal Of Smooth Muscle Research**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.65-81, 2008. Japan Society of Smooth Muscle Research. <http://dx.doi.org/10.1540/jsmr.44.65>.

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca²⁺-release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 17997 - 18004, 1989.

KOHLER, M. B.; HIRSCHBERG, C.T. BOND, et al., Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain, **Science**, v273. p.1709–1714. 1996.

KOROVKINA, V.P.; FERGUS, D.J.; HOLDIMAN, A.J.; ENGLAND, S.K. Characterization of a novel 132-bp exon of the human maxi-K channel. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. 2001;281:C361–7

LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 385-399, 1989.

LINCOLN, T. M.; KOMALAVILAS, P. Cyclic GMP-mediated signaling mechanisms in smooth muscle. In: Nitric Oxide, edited by Ignarro L. **Journal New York: Academic**, p. 401– 4425, 2000.

LONGO, M.; JAIN, V.; VEDERNIKOV, Y. P.; HANKINS, G.D.; GARFIELD, R. E.; SAADE, G. R. Effects of L-type Ca²⁺-channel blockade, K⁺ATP-channel opening and nitric oxide on human uterine contractility in relation to gestational age and labour. **Molecular Human Reproduction**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.159-164, 1 mar. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gag023>.

LOVASZ, N.; KONCZ, A.; DOMOKOS, D.; GASPAR, R.; FALKAY, G. ATP-sensitive potassium channels modulate in vitro tocolytic effects of β_2 -AR agonists on uterine

muscle rings in rats in early but not in late pregnancy. **Croatian Medical Journal**, [s.l.], v. 56, n. 2, p.114-118, abr. 2015. Croatian Medical Journal. <http://dx.doi.org/10.3325/cmj.2015.56.114>.

MANDACHE, E.; POPESCU, L.M.; GHERGHICEANU, M. Myocardial interstitial Cajal-like cells (ICLC) and their nanostructural relationships with intercalated discs: shed vesicles as intermediates. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.1175-1184, set. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00117.x>.

MANDI, G.; SARKAR, S.; MISHRA, S.; RAVIPRAKASH, V. Effects of calcium channel blocker, mibefradil, and potassium channel opener, pinacidil, on the contractile response of mid-pregnant goat myometrium. **Indian journal of experimental biology**, v. 43 n.9, p.795-801. October 2005.

MARIN, R. M. Efeitos de compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de tirosina quinase em corações isolados de ratos. 2003. 80f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Estadual de Campinas. 2003.

MATHAROO-BALL, B.; ASHFORD, M.L.; ARULKUMARAN, S. KHAN, R.N. Down-Regulation of the α - and β -Subunits of the Calcium-Activated Potassium Channel in Human Myometrium with Parturition1. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 68, n. 6, p.2135-2141, 1 jun. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.102.010454>.

MAZZONE, J.; BUXTON, I.L. Changes in small conductance potassium channel expression in human myometrium during pregnancy measured by RT-PCR, Proc. West. **Pharmacol. Soc.** 46 (2003) 74–77.

McFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **The British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.

McMANUS, O.B.; HELMS, L.M.; PALLANCK, L.; GANETZKY, B.; SWANSON, R.; LEONARD, R.J. Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. **Neuron**. 1995;14:645–50

MODZELEWSKA, B.; KOSTRZEWSKA, A.; SIPOWICZ, M.; KLESZCZEWSKI, T.; BATRA, S. Apamin inhibits NO-induced relaxation of the spontaneous contractile activity of the myometrium from non-pregnant women. **Reproductive Biology And Endocrinology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.8-9, 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-1-8>.

MODZELEWSKA, B.; KLESZCZEWSKI, T.; KOSTRZEWSKA, A. The effect of a selective inhibition of potassium channels on the relaxation induced by nitric oxide in the human pregnant myometrium. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.8, p.69-75. 2003.

MOUTQUIN, J.M.; SHERMAN, D.; COHEN, H.; et al. Double-blind, randomized, controlled trial of atosiban and ritodrine in the treatment of preterm labor: A multicenter effectiveness and safety study. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 182, n. 5, p.1191-1199, maio 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1067/mob.2000.104950>.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of th gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, p. 345-374, 2006.

NOVAKOVIĆ, R., MILOVANOVIĆ, S., PROTIĆ, D., ĐOKIĆ, J., HEINLE, H., GOJKOVIĆ-BUKARICA, L. J. (2007): The effect of potassium channel opener pinacidil on the non-pregnant rat uterus. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology Journal**. 101, 181–186

NAKAMURA, K.; KOGA, Y.; SAKAI, H.; HOMMA, K.; IKEBE, M. CGMP-Dependent Relaxation of Smooth Muscle Is Coupled With the Change in the Phosphorylation of Myosin Phosphatase. **Circulation Research**, [s.l.], v. 101, n. 7, p.712-722, 2 ago. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.107.153981>

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, n. 55, p. 597–606, 2003.

OHKUBO, Tsuyako et al. Identification and Electrophysiological Characteristics of Isoforms of T-type Calcium Channel Cav3.2 Expressed in Pregnant Human Uterus. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 16, n. 4-6, p.245-254, 15 nov. 2005. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000089850>.

OSMAN, I.; YOUNG, A.; LEDINGHAM, M.A.; THOMSON, A.J.; JORDAN, F.; GREER, I.A.; NORMAN, J.E. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labor at term. **Mol Hum Reprod**. 2003;9:41–45.

OTAIBI, M, A. The physiological mechanism of uterine contraction with emphasis on calcium ion. **Calcium Signaling**, [S.I.L.], v. 1, n. 2, p.70-75, jun. 2014.

OKAWA, T.; LONGO, M.; VEDERNIKOV, Y.P.; CHWALISZ, K.; SAADE, G.R.; GARFIELD, R.E. . Role of nucleotide cyclases in the inhibition of pregnant rat uterine contractions by the openers of potassium channels. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 182, n. 4, p.913-918, abr. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378\(00\)70346-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378(00)70346-2).

OKAWA, T.; VEDERNIKOV, Y.P.; SAADE, G.R.; LONGO, M.; OLSON, G.L.; CHWALISZ, K. et al. Roles of potassium channels and nitric oxide in modulation of uterine contractions in rat pregnancy. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 181, n. 3, p.649-655, set. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378\(99\)70508-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378(99)70508-9).

PANCOTE, C, G.; CERA, T. C. Planejamento de fármacos. **Revista Científica da Unilago**, São José do Rio Preto - Sp, p.137-148, 2009.

PATI, B.; BANERJEE, S. Quinazolines: An Illustrated Review. **J. Adv. Pharm. Educ. Res.** 2013, 3

PAUL, R.j.. The role of phospholamban and SERCA3 in regulation of smooth muscle-endothelial cell signalling mechanisms: evidence from gene-ablated mice. **Acta Physiologica Scandinavica**, [s.l.], v. 164, n. 4, p.589-597, dez. 1998. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-201x.1998.tb10704.x>.

PIERCE, S.L.; KRESOWIK, J.D.; LAMPING, K.G.; ENGLAND, S.K. Overexpression of SK3 channels dampens uterine contractility to prevent preterm labor in mice, **Biol. Reprod.** **78** (2008) 1058–1063.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POPESCU, L.M.; GHERGHICEANU, M.; HINESCU, M.E.; CRETOIU, D.; CEAFALAN, L.; REGALIA, T.; POPESCU, A.C.; ARDELEANU, C.; MANDACHE, E. Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.429-458, abr. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00410.x>.

POPESCU, L. M.; CIONTEA, S. M.; CRETOIU, D.. Interstitial Cajal-Like Cells in Human Uterus and Fallopian Tube. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1101, n. 1, p.139-165, 15 fev. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1389.022>.

RADU, E.; REGALIA, T.; CEAFALAN, L.; ANDREI, F.; CRETOIU, D.; POPESCU, L. M. Cajal-type cells from human mammary gland stroma: phenotype characteristics in

cell culture. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 9: 748–752. 2005. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00509.x

ROBERTS, M. F.; WINK, M. **Introduction Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications**, 1998.

SAH, P.; FABER, E. S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 345–353, 2002.

SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SANDOO, A.; VAN ZANTEN, J. J. C. S. V.; METSIOS, G. S.; CARROLL, D.; KITAS, G. D. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, p. 302-312. 2010.

SANBORN, B. M. Cell and molecular biology of myometrial smooth muscle function. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.287-288, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2007.05.001>.

SANBORN, B. M. Relationship of Ion Channel Activity to Control of Myometrial Calcium. **Reproductive Sciences**, [s.l.], v. 7, p.4-11, 1 jan. 2000

SANBORN, B. M. Ion channels and the control of myometrial electrical activity. **Seminars In Perinatology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.31-40, fev. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0146-0005\(95\)80045-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0146-0005(95)80045-x).

SERGEANT, G. P.; HOLLYWOOD, M.A.; MCCLOSKEY, K.D.; THORNBURY, K.D.; MCHALE, N. G. Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra. **The Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 526, n. 2, p.359-366, jul. 2000. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00359.x>.

SELVAM, T.; KUMAR, P.; VIJAYARAJ, P. Quinazoline Marketed drugs—A Review. **Res. in Pharm.** 2011, 1, 1-21.

SHIMANO, M.; NAKAYA, Y.; FUKUI, R.; KAMADA, M.; HAMADA, Y.; MAEDA, K. et al. Activation of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in Human Myometrium by Nitric Oxide. **Gynecologic And Obstetric Investigation**, [s.l.], v. 49, n. 4, p.249-254, 19 maio 2000. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000010254>.

SHMIGOL, A. V.; EISNER, D. A.; WRAY, Susan. The role of the sarcoplasmic reticulum as a Ca^{2+} -sink in rat uterine smooth muscle cells. **The Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 520, n. 1, p.153-163, out. 1999. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00153.x>

SHUNSUKE, H. M. D.; JOELLE, H. S. M. A. Combination of low dose L type Calcium channel blockade with calcium-activated chloride channel anoctamin 1 (ANO1) antagonism potentiates relaxation of pre-contracted murine uterine smooth muscle (mUSM). In: **SOAP 49TH ANNUAL MEETING: BEYOND THE OBSTETRIC SUITE, 49., 2017**, Washington. Anais. New York: Soap, 2017. p. 99 - 99.

SILVERTHORN, Dee U.; **Fisiologia Humana** – Uma abordagem integrada. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SOMLYO; SOMLYO. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. **Acta Physiologica Scandinavica**, [s.l.], v. 164, n. 4, p.437-448, dez. 1998. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-201x.1998.00454.x>.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiology Reviews*, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

SPERELAKIS, Nicholas; INOUE, Yoshihito; OHYA, Yusuke. Fast Na^{+} -channels in smooth muscle from pregnant rat uterus. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, [s.l.], v. 70, n. 4, p.491-500, abr. 1992. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/y92-064>

STANDEN, N. B.; QUAYLE, J. M.; DAVIES, N. W.; BRAYDEN, J. E.; HUANG, Y.; NELSON, M. T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^{+} channels in arterial smooth muscle. **Science**, v. 245, p. 177-180, 1989.

STULL, J. T.; TANSEY, M. G.; TANG, D, C.; WORD, R. A.; KAMM, K.E. Phosphorylation of myosin light chain kinase: a cellular mechanism for Ca^{2+} desensitization. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 127-128, n. 1, p.229-237, nov. 1993. Springer Nature.

SUCIU, L.; POPESCU, L. M.; GHERGHICEANU, M. Human placenta: de visu demonstration of interstitial Cajal-like cells. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.590-597, maio 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00058.x>.

SUZUKI, T.; TAKIMOTO, K. Differential expression of Kv4 pore-forming and KChIP auxiliary subunits in rat uterus during pregnancy. *Ajp: Endocrinology and Metabolism*, [s.l.], v. 288, n. 2, p.335-341, 1 fev. 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00250.2004>.

TAGGART, M. J. 2001. Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *Physiology*, 16, 61-65.

TAGGART, M. J.; WRAY, S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *The Journal Of Physiology*, [s.l.], v. 511, n. 1, p.133-144, ago. 1998. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.133bi.x>.

TAGGART, M. J.; MORGAN, K. G.. Regulation of the uterine contractile apparatus and cytoskeleton. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, [s.l.], v. 18, n. 3, p.296-304, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.05.006>.

TRAVASSOS, R.A. Mecanismos de sinalização endotelial e modulação de canais para cálcio e potássio na atividade relaxante do alcaloide sintético 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquilina em aorta isolada de rato . 2015. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)** - Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa. 2015

TSAI, M. L.; CUMMINGS, K. C.; WEBB, R. C.; CARUSO, R. L. Acute Inhibition of Spontaneous Uterine Contractions by an Estrogenic Polychlorinated Biphenyl Is Associated with Disruption of Gap Junctional Communication *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 152, p. 18–29. 1998.

TONG, D., XUERONG, L. U.; HONG, X. W.; ISABELLE, P.; LUI, E. D.; DALE, W. L.; DONGLIN, B.; GERALD M. K. A Dominant Loss-of-Function GJA1 (Cx43) Mutant Impairs Parturition in the Mouse1. *Biology Of Reproduction*, [s.l.], v. 80, n. 6, p.1099-1106, 1 jun. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.071969>.

TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D. J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct Roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in Spatial Regulation of MLC Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3T3 Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, v. 150, p. 797 – 806. 2000.

TRIBE R.M.; MORIARTY, P.; POSTON L. Calcium Homeostatic Pathways Change with Gestation in Human Myometrium. *Biology of Reproduction*. v. 3, p.748-755. 2000.

ULMSTEN, U. M. D.; ANDERSSON, K-E M. D.; FORMAN, A. M. B. Relaxing effects of Nifedipine on the nonpregnant human uterus in vitro and in vivo. **Obstetrics & Gynecology**, v.52, p.436-41. 1978.

VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium-Calcium interaction in mammalian smooth muscle. **Pharmacology Reviews**, v. 30, p. 167-208, 1979.

VAN GESTEL, I. Endometrial wave-like activity in the non-pregnant uterus. **Human Reproduction Update**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.131-138, 1 mar. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmg011>.

VENKATACHALAM, K.; VAN ROSSUM, D. B.; PATTERSON, R. L.; MA, H. T.; GILL, D. L. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. **Nature Cell Biology**, [s.l.], v. 4, n. 11, p.263-272, nov. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1102-e263>.

XIA, X.M.; FAKLER, B.; RIVARD, A.; WAYMAN, G.; JOHNSON-PAIS, T.; KEEN, J.E. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. **Nature**, 395:503–7, 1998.

WANG, D.; GAO, F. Quinazoline derivatives: synthesis and bioactivities. **Chem. Cent. J.** 2013, 7, 95.

WALKER, F.M.; POYSER, N.L. The metabolism of prostaglandins by the guinea-pig uterus with particular reference to corpus luteal maintenance in early pregnancy. **British Journal of Pharmacology**. 1978;62(2):177-183.

WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 289-298, 2005.

WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WULFF, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. **Pharmacology Reviews**, v. 57, p. 463–472, 2005.

WRAY, S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. C1-C18, 1993.

WIRTH, A.; OFFERMANN, S. G-Protein-Coupled Receptors in Smooth Muscle. *Muscle - Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, p. 1145-1153, 2012.

WORLDWIDE ATOSIBAN VERSUS BETA-AGONISTS STUDY GROUP. Effectiveness and safety of the oxytocin antagonist atosiban versus beta-adrenergic agonists in the treatment of preterm labour. The Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group. **British Journal of Obstetrics and Gynecology**, n.108, p.133–142.2001

YANG, M.; GUPTA, A.; SHLYKOV, S. G.; CORRIGAN, R.; TSUJIMOTO, S.; SANBORN, B. M. Multiple Trp Isoforms Implicated in Capacitative Calcium Entry Are Expressed in Human Pregnant Myometrium and Myometrial Cells¹. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.988-994, 1 set. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.102.004119>.

YANG, E. K.; ALVIRA, M. R.; LEVITAN, E. S.; TAKIMOTO, K. Kv β Subunits Increase Expression of Kv4.3 Channels by Interacting with Their C Termini. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 276, n. 7, p.4839-4844, 21 nov. 2000. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m004768200>.

YOSHIDA, T.. Molecular Determinants of Vascular Smooth Muscle Cell Diversity. **Circulation Research**, [s.l.], v. 96, n. 3, p.280-291, 20 jan. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.0000155951.62152.2e>.

YOUNG, R. C.; SMITH, L. H.; McLAREN, M. D. T-type and L-type calcium currents in freshly dispersed human uterine smooth muscle cells. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 169, n. 4, p.785-792, out. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(93\)90006-5](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(93)90006-5).

YOUNG, R. C.. Myocytes, Myometrium, and Uterine Contractions. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**. [s.l.], v. 1101, n. 1, p.72-84, 15 fev. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1389.038>.



YOUNG, R; ZHANG, P. Inhibition of In Vitro Contractions of Human Myometrium by Mibefradil, a T-Type Calcium Channel Blocker: Support for a Model Using Excitation-Contraction Coupling, and Autocrine and Paracrine Signaling Mechanisms. **Journal Of The Society For Gynecologic Investigation**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.7-12, maio 2005. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsig.2005.02.007>.

ZHENG, W.; RAMPE, D.; TRIGGLE, D.J. Pharmacological, radioligand binding, and electrophysiological characteristics of FLP 64176, a novel nondihydropyridine Ca²⁺

channel activator, in cardiac and vascular preparations. **Molecular Pharmacology**, v. 40, p. 734-741, 1991.

ZWEIFACH, A.; LEWIS, R. S. Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. **The Journal Of General Physiology**, [s.l.], v. 105, n. 2, p.209-226, 1 fev. 1995. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.105.2.209>.

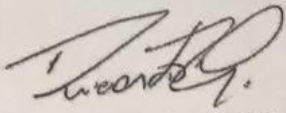
ANEXO A – Certidão 070/2016 da Comissão de Ético no Uso de Animais da UFPB

	UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	
---	---	---

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Bioprospecção de substâncias sintéticas com atividade moduladora sobre canais iônicos em musculatura lisa uterina**”, protocolo nº **070/2016** sob a responsabilidade do pesquisador **Dr. Rafael de Almeida Travassos** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2016 – 2017
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i>
Número de animais	30
Idade/Peso	180-250 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George


Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB

CEUA-UFPB – Campus I – Reitoria - 1ª andar - E-mail: ceua@ufpb.br – Site: www.ufpb.br/ceua/